

**UNTERSUCHUNGEN ZUR VERÄNDERUNG
VON STRUKTUR UND AKTIVITÄT DER IMMUNGLOBULINE DES HUHNES
NACH INKUBATION DES SERUMS MIT 2-MERCAPTOÄTHANOL**

ISABELLA UEBEL

*Diss
München
1974*

AUS DEM INSTITUT FÜR
PHYSIOLOGIE, PHYSIOLOGISCHE CHEMIE UND ERNÄHRUNGSPHYSIOLOGIE
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
GESCHÄFTSFÜHRENDER VORSTAND: PROF. DR. H. ZUCKER

Angefertigt unter Leitung von
PROF. DR. U. LÖSCH

**UNTERSUCHUNGEN ZUR VERÄNDERUNG
ON STRUKTUR UND AKTIVITÄT DER IMMUNGLOBULINE DES HUHNES
NACH INKUBATION DES SERUMS MIT 2-MERCAPTOÄTHANOL**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
ISABELLA UEBEL
aus Baunach

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. G. Terplan

Tag der Promotion: 27. Juli 1984

Index

44	Antikörper
45	Antikörper
46	Antikörper
47	Antikörper
48	Antikörper
49	Antikörper
50	Antikörper
51	Antikörper
52	Antikörper
53	Antikörper
54	Antikörper
55	Antikörper
56	Antikörper
57	Antikörper
58	Antikörper
59	Antikörper
60	Antikörper
61	Antikörper
62	Antikörper
63	Antikörper
64	Antikörper
65	Antikörper
66	Antikörper
67	Antikörper
68	Antikörper
69	Antikörper
70	Antikörper
71	Antikörper
72	Antikörper
73	Antikörper
74	Antikörper
75	Antikörper
76	Antikörper
77	Antikörper
78	Antikörper
79	Antikörper
80	Antikörper
81	Antikörper
82	Antikörper
83	Antikörper
84	Antikörper
85	Antikörper
86	Antikörper
87	Antikörper
88	Antikörper
89	Antikörper
90	Antikörper
91	Antikörper
92	Antikörper
93	Antikörper
94	Antikörper
95	Antikörper
96	Antikörper
97	Antikörper
98	Antikörper
99	Antikörper
100	Antikörper

Meinen Eltern

Abkürzungen

Ak	Antikörper
B. abortus	Brucella abortus
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HSA	Humanserumalbumin
Ig	Immunglobulin
2-ME	2-Mercaptoäthanol
MG	Molekulargewicht
PAGE-CIEP	Polyacrylamidgelelektrophorese in Kombination mit Zweidimensionaler Immunelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Literatur	
1.1. Immunglobuline	1
Grundstruktur der Immunglobuline	2
IgG	4
IgM	5
IgA	6
Molekulargewichte der Immunglobuline des Huhnes	9
1.2. Disulfidbrücken im Immunglobulinmolekül	10
1.3. Reduktion	11
1.4. Problemstellung	14
1.5. Literatur zur partiellen Reduktion der Immunglobuline	16
IgG	16
IgM	18
IgA	20
2. Material und Methoden	
2.1. Tiermaterial	22
2.2. Antigene	23
2.3. Immunisierung	23
2.4. Entbluten der Hühner und Serumgewinnung	24
2.5. Rocket-Immunelektrophorese	24

	<i>Seite</i>
2.6. Bestimmung der Agglutinationstiter	25
Passive Hämagglutination	26
Direkte Brucellenagglutination	28
2.7. 2-Mercaptoäthanol-Behandlung der Seren vor Ansatz des ELISA und der Affinitäts- chromatographie	29
2.8. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	30
2.9. Affinitätschromatographie	34
2.10. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.11. SDS-PAGE in Kombination mit Zweidimensio- naler Immunelektrophorese (PAGE-CIEP)	42
2.12. Versuchsablauf	44
 3. Ergebnisse	
3.1. Erstellung der Serumpools	48
3.2. Immunglobulinkonzentrationen der Serum- pools	51
3.3. Ergebnisse der Agglutination	52
3.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Auf- trennung der Proteine in den unbehandelten und mit 2-Mercaptoäthanol behandelten Se- rumpools	55
3.5. Ergebnisse des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	57
Titerveränderungen bei den IgG-Antikörpern	58
Titerveränderungen bei den IgM-Antikörpern	60
Titerveränderungen bei den IgA-Antikörpern	62

	<i>Seite</i>
3.6. Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptide mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	65
3.7. Zuordnung der durch 2-Mercaptoäthanol-Be- handlung entstandenen Antikörperbruchstük- ke zu den einzelnen Immunglobulinen mit der PAGE-CIEP	68
4. <i>Diskussion</i>	71
1. Aktivitätsänderungen	72
1.1. Agglutination	72
1.2. Antikörperbindung	74
2. Strukturänderungen	86
5. <i>Zusammenfassung</i>	97
6. <i>Summary</i>	100
7. <i>Literaturverzeichnis</i>	I - XVI

1. Einleitung und Literatur

1.1. Immunglobuline

Das immunologische System eines Organismus wahrt die biologische Unversehrtheit des Individuums. Es hat einge-drungene Fremdsubstanzen - *Antigene* - zu erkennen und diese ebenso wie im Körper selbst entstandene und vom Abwehrsystem als "fremd" erkannte Produkte zu neutralisieren. Das Immunsystem besteht aus der *zellvermittelten* und der *humoralen Abwehr*.

Das *humorale Immunsystem* von Vertebraten beruht auf der Bildung von *Antikörpern* durch Plasmazellen. Ein Antikörper ist ein Protein, das im Organismus nach Kontakt mit einem Antigen gebildet wird und mit diesem spezifisch reagiert. Auf diese Weise kann der Fremdkörper für den Organismus unschädlich gemacht werden. Die Antikörper verhalten sich chemisch wie die Globuline des Blutserums und werden deshalb als *Immunglobuline* bezeichnet.

Die Einteilung der Immunglobuline in Klassen erfolgt auf Grund bestimmter Kriterien, nämlich der antigenen Eigenschaften der H-Ketten, dem Molekulargewicht und der elektrophoretischen Wanderung. Weitere Unterscheidungsmerkmale sind: Sedimentationsgeschwindigkeit in der Ultrazentrifuge (Sedimentationskonstante, als "S" angegeben), Aminosäurezusammensetzung, Kohlenhydratgehalt und biologische Funktion.

Beim *Menschen*, der am besten untersuchten Art, werden heute fünf Klassen von Immunglobulinen unterschieden, die nach der standardisierten Nomenklatur der Weltgesundheitsorganisation (1964) als *IgG*, *IgM*, *IgA*, *IgD* und *IgE* bezeichnet werden.

Die Säugetiere besitzen analoge Immunglobuline, bis jetzt wurden aber nicht bei allen untersuchten Arten alle Immunglobulinklassen gefunden. Die Charakterisierung der tierischen Immunglobuline erfolgt durch den Vergleich mit denen des Menschen.

Beim *Huhn* konnten bisher nur drei Immunglobulinklassen isoliert und charakterisiert werden, nämlich *IgG*, *IgM* und *IgA*.

Die Mehrzahl der Untersuchungen der Immunglobuline des Menschen (und zum Teil der Maus) hinsichtlich Struktur und Eigenschaften wurden mit natürlichen *monoklonalen Antikörpern* durchgeführt, die bei tumorartigen Wucherungen der retikulären Plasmazellen des Knochenmarks gebildet werden. Dabei synthetisiert die Zelle weiterhin ein spezifisches Immunglobulin (Myelomprotein).

Diese Immunglobuline sind chemisch einheitlich, da sie von Plasmocytomen stammen, die sich aus einer Zelle entwickelt haben (monoklonal).

Die Myelomproteine sind völlig normale Bestandteile des Immunglobulin-Spektrums; sie können aber in viel höherer Konzentration gewonnen werden als die normalen Immunglobuline (HILSCHMANN et al., 1975).

Grundstruktur der Immunglobuline

Die Immunglobuline besitzen zwei bestimmte Typen von Polypeptidketten. Die kleinere davon (*L-Kette* = light chain) ist charakteristisch für die ganze Gruppe der Proteine, sie ist in allen Immunglobulinen vorhanden. Die größere Polypeptidkette (*H-Kette* = heavy chain) wird je nach Immunglobulinklasse als γ -, μ -, α -, δ - oder ϵ -Kette bezeichnet, da sie die Klasse bestimmt.

Jede der Polypeptidketten, sowohl die H- als auch die L-Kette weist eine *variable* aminoterminal (bei der Antigenbindungsstelle) und eine *konstante* carboxyterminale Hälfte auf (siehe Abb.1), d.h. in der variablen Region, die für die Spezifität verantwortlich ist, variiert die Aminosäuresequenz, während sie im Bereich der konstanten Region bei jedem Kettentyp identisch ist (HILSCHMANN et al., 1975).

Die Ketten sind zu je zwei Paaren von identischen H- und L-Ketten gruppiert, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb.1).

Außerdem enthalten alle Immunglobuline noch einen Kohlenhydratanteil, der beim *Huhn* bei IgG 2,2 % und bei IgM 2,6 % beträgt (LESLIE und CLEM, 1969).

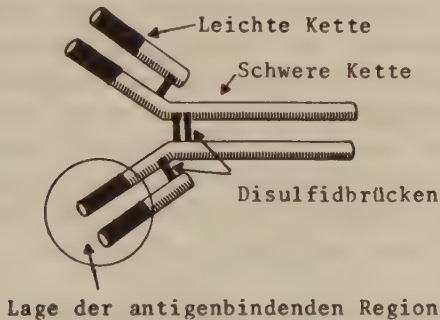


Abb.1: Einfaches Modell eines IgG-Moleküls
(nach TIZARD, 1981)

Immunglobulin IgG

Aus dieser Grundstruktur (vier Polypeptidketten; zwei γ - und zwei L-Ketten) besteht das IgG. Obwohl diese Struktur aus zwei völlig identischen Doppelketten aufgebaut ist, wird sie als *Monomer* bezeichnet.

Am Ende eines jeden Armes befindet sich je eine Antigenbindungsstelle, d.h. das Molekül ist divalent (siehe Abb.1).

Das *Molekulargewicht* des IgG beträgt beim *Huhn* etwa 170.000, das der H-Kette etwa 67.500 und das der L-Kette etwa 22.000 (LESLIE und CLEM, 1969; siehe S.9).

Das MG des *humanen* IgG liegt bei etwa 150.000 (ROITT, 1977).

Die *Sedimentationskonstante* wird beim *Huhn* mit 7,1 S angegeben (LESLIE und CLEM, 1969), beim *Menschen* mit 7 S (ROITT, 1977).

Da sich das IgG des Huhnes vom menschlichen IgG in einigen Eigenschaften unterscheidet (Molekulargewicht und Kohlenhydratgehalt höher, isoelektrischer Punkt niedriger, Nettoladung elektronegativer als beim Menschen), schlugen LESLIE und CLEM (1969) vor, dieses Immunglobulin des Huhnes als *IgY* zu bezeichnen. Da es aber funktionell und biologisch dem IgG des Menschen entspricht, hat sich die alte Nomenklatur *IgG* auch beim Huhn durchgesetzt.

Das IgG bildet die Hauptmenge der Immunglobuline im Blut (beim *Huhn* 5,3 mg/ml, LESLIE und CLEM, 1970) und es diffundiert leichter als die anderen Immunglobuline in die extravaskulären Räume des Körpers.

Die *biologische Funktion* des IgG ist die Neutralisierung von Toxinen und Viren im Extrazellulärraum. Unter Mithil-

fe des Komplementsystems, das von IgG aktiviert werden kann, ist es auch zur Bakteriolyse und Virolyse (Viren mit Hülle) befähigt (v.FELLENBERG, 1978).

Immunglobulin IgM

IgM-Moleküle sind aus mehreren Vier-Peptid-Untereinheiten zusammengesetzt und werden deshalb auch als *polymere* Immunglobuline oder *Makroglobuline* bezeichnet.

Fünf monomere Untereinheiten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden (BEALE und FEINSTEIN, 1969). In der Mitte des Moleküls befindet sich ein *J-Protein* (Joining Protein). Theoretisch sollte IgM eine Valenz von zehn aufweisen, also zehn Antigenbindungsstellen haben, jedoch erfolgt in den meisten Fällen aus stereochemischen Gründen nur eine Bindung mit fünf Antigenmolekülen (CHAVIN und FRANKLIN, 1969; BIER et al., 1979).

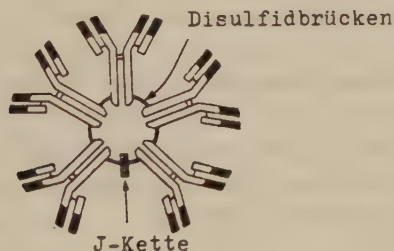


Abb.2: Struktur von IgM (TIZARD, 1981)

Das *Molekulargewicht* des IgM des *Huhnes* wurde von LESLIE und CLEM (1969) mit etwa 890.000 berechnet. Das IgM schien auch beim Huhn als Pentamer vorzuliegen. Eine H-Kette hatte ein MG von 70.000, eine L-Kette von 22.000 (siehe S.9). Das MG des *menschlichen* IgM beträgt 900.000 (ROITT, 1977).

KOBAYASHI und HIRAI (1980) fanden beim Huhn zwei verschiedene Formen von IgM, die unterschiedliche Molekulargewichte besaßen. Die Hauptmenge (70 %) bestand aus einem IgM mit einem MG von 860.000, das MG des übrigen IgM betrug 680.000. Die Autoren nahmen an, daß das IgM mit dem MG 860.000 in pentamerer und das leichtere IgM in tetramerer Form vorlag. Eine H-Kette hatte ein MG von 67.000, während L-Ketten mit einem MG von 21.000 und 25.000 auftraten.

Die *Sedimentationskonstante* des IgM vom *Huhn* liegt bei 16,7 S (LESLIE und CLEM, 1969), beim *Menschen* bei 19 S (ROITT, 1977).

Im Serum ist IgM in geringerer Menge vorhanden als IgG, nämlich beim *Huhn* etwa 0,71 mg/ml (LESLIE und CLEM, 1970) bzw. 1,35 mg/ml (CHHABRA und GOEL, 1980).

Wegen ihrer starken Bindungswalenz besitzen die IgM-Antikörper eine äußerst stark agglutinierende und zytolytische Aktivität. Sie treten sehr frühzeitig bei der Immunantwort gegen Infektionen auf und kommen vorwiegend im Blut vor (v.FELLENBERG, 1978).

Immunglobulin IgA

IgA ist ein Immunglobulin, das zur Bildung von polymeren Formen neigt. Am häufigsten tritt im Serum eine *dimere* Form auf, die durch eine J-Kette verbunden ist; es gibt auch *mono-* und *trimere* Strukturen.

In den Sekreten liegt es als *sekretorisches IgA* vor, das sich vom Serum-IgA durch die *Sekretkomponente* unterscheidet.

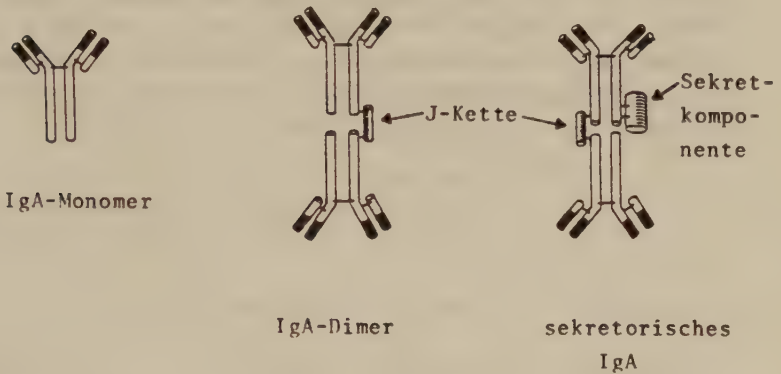


Abb.3: Die Struktur verschiedener Formen von IgA
(TIZARD, 1981)

Das *Molekulargewicht* der monomeren Form wird beim *Huhn* mit etwa 175.000, das der H-Kette mit etwa 70.000 angegeben (LESLIE und MARTIN, 1973; siehe S.9), beim *Menschen* hat monomeres IgA ein MG von 160.000 (ROITT, 1977).

Die *Sedimentationskonstante* der monomeren Form im Serum liegt beim *Huhn* bei 7 S, es kommen aber auch polymere Formen vor (PORTER und PARRY, 1976).

Beim *Menschen* treten 7 S, 9 S und 11 S als Sedimentationskonstanten beim IgA des Serums auf (ROITT, 1977).

Die Konzentration an IgA im Serum beträgt beim *Huhn* ca. 0,6 mg/ml (LESLIE und MARTIN, 1973) bzw. 0,4 mg/ml (RAM-

MENSEE, 1984), während sie in der Galle z.B. höher liegt ($> 0,8$ mg/ml, LESLIE und MARTIN, 1973; 6,7 mg/ml, RAMMEN-SEE, 1984).

IgA ist das wichtigste Immunglobulin der äußeren Körpersekrete. Seine *biologische Funktion* liegt in der Neutralisation von Viren. Wahrscheinlich verhindert es wirksam die Anheftung und Kolonisierung von Bakterien an die Körperoberflächen (v.FELLENBERG, 1978).

Molekulargewichte der Immunglobuline des Huhnes

	<i>IgG</i>	<i>IgM</i>	<i>IgA</i>
Polymer	- -	920.000 (f) 890.000 (c) 860.000 (e) pentamere Form 680.000 (e) tetramere Form	340.000 (f)
Monomer	174.000 (b)	184.000 (f)	170. bis 180.000 (d)
	170.000 (c)	174.000 (c)	170.000 (f)
H-Kette	67.500 (c)	70.000 (c)	70.000 (d)
	63.000 (e)	67.000 (e)	65.000 (e)
L-Kette	22.000 (c)	22.000 (c)	
	21. und 25.000 (e)	21. und 25.000 (e)	21. und 25.000 (e)
Fc-Stück	54.000 (a)		

Quellen:

- (a) DREESMAN und BENEDICT, 1965b
- (b) DREESMAN, 1966
- (c) LESLIE und CLEM, 1969
- (d) LESLIE und MARTIN, 1973
- (e) KOBAYASHI und HIRAI, 1980
- (f) SCHRANNER und LÖSCH (in Vorbereitung)

1.2. Disulfidbrücken im Immunglobulinmolekül

Im Immunglobulinmolekül treten an verschiedenen Stellen Disulfidbrücken auf (auf Subklassen- und Speziespezifitäten wird hier nicht näher eingegangen):

a) Im IgG-Molekül liegen Disulfidbrücken

- innerhalb der Polypeptidketten = *innerkettige Disulfidbrücken*
 - zwischen den H- und L-Ketten
 - zwischen den H-Ketten
- } = *zwischenkettige Disulfidbrücken*

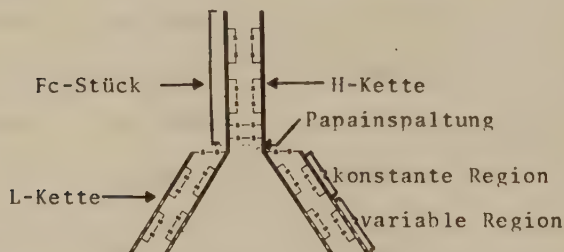


Abb.4: Inner- und zwischenkettige Disulfidbrücken im IgG-Molekül (WEIR, 1973)

b) Das IgM-Molekül enthält zu den eben genannten noch folgende Disulfidbrücken (siehe Abb.2):

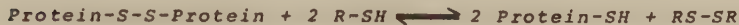
- zwischen den Untereinheiten
- zwischen H- und J-Ketten

c) Im IgA-Molekül (dimere Serumform) treten neben den für IgG beschriebenen noch Disulfidbrücken auf (siehe Abb.3):

- zwischen H- und J-Ketten

1.3. Reduktion

Bei der Reduktion der Immunglobuline werden Disulfidbrücken im Molekül mit Hilfe eines *Sulphydrylreagenz* (*Reduktionsmittels*; *R-SH*) gespalten. Es läuft folgende Reaktion ab:



Als Reduktionsmittel verwendet man u.a. *Mercaptane*, z.B. 2-Mercaptoäthanol (2-ME) und *Thiole*, z.B. Dithiothreitol (DTT) oder Dithioerythritol (DTE).

1957 beschrieben DEUTSCH und MORTON, daß es ihnen gelungen war, Makroglobuline des Menschen (*IgM*) mit 0,1 m 2-ME (bei Zimmertemperatur für 24 bis 48 Stunden) zu reduzieren. Dabei waren einheitliche Bruchstücke mit einer Größe von 6,5 S, also monomere Formen, entstanden, die inaktiv waren. Bei Entzug des Reduktionsmittels durch Dialyse fand eine Reaggregation der *IgM*-Fragmente statt. Die entstandenen Aggregate unterschieden sich aber in der Sedimentationskonstante etwas vom Ausgangsmaterial. Durch Zugabe einer alkylierenden Substanz (z.B. Jodacetamid), die die freien Sulphydrylgruppen blockiert, konnte eine Reaggregation der *IgM*-Bruchstücke verhindert werden.

Die Sedimentationskonstante und die Aktivität des *IgG* wurden durch die 2-ME-Behandlung nicht beeinflusst.

In der Folgezeit wurden dann weitere Untersuchungen zu dieser *partiellen* oder *milden Reduktion* (im Gegensatz zur *vollständigen Reduktion*) der Immunglobuline durchgeführt.

Bei der *milden Reduktion* werden abhängig vom Reduktionsmittel verschiedene Disulfidbrücken im Immunglobulinmole-

kül gespalten (hier nur die Reduktion mit 2-ME und DTT oder DTE berücksichtigt).

Im *IgG-Molekül* des *Menschen* werden 3 - 5 Disulfidbrücken gespalten. Zwei davon sind Brücken zwischen H- und L-Ketten und mindestens eine verbindet die zwei H-Ketten (FLEISCHMAN et al., 1962).

Bei der milden Reduktion des *menschlichen IgM-Moleküls* werden acht Disulfidbrücken pro monomerer Untereinheit gespalten, d.h. etwa ein Drittel der Disulfidbrücken im Makromolekül werden getrennt (McDOUGALL und DEUTSCH, 1964).

Bei dieser Reduktion werden nur zwischenkettige und keine innerkettigen Disulfidbrücken gespalten (MILLER und METZGER, 1965b).

Über die Spaltung der Anzahl der Disulfidbrücken im *IgA-Molekül* des Serums der *Säuger* und der *aviären* Immunglobuline ist bisher nichts bekannt.

Bei der *vollständigen Reduktion* werden die Immunglobuline in ihre einzelnen Ketten zerlegt, d.h. alle zwischenkettigen Disulfidbrücken werden gespalten und die nicht-kovalenten Bindungen getrennt.

Dazu ist eine höhere Konzentration an Reduktionsmittel, Ansäuern der Lösung mit organischen Säuren (Essig- oder Propionsäure) oder die Zugabe von dispergierenden Mitteln (Harnstoff, Guanidin, SDS) zum Puffer bei pH 8,0 - 8,6 nötig.

Reduktionsmittel wirken nur auf die Disulfidbrücken, während eine hohe Wasserstoffionenkonzentration und Dispersionsmittel intramolekulare Wasserstoffbrücken, hydrophobe und elektrostatische Kräfte aufheben bzw. verändern.

Die meisten Autoren arbeiten bei der *milden Reduktion* mit einer 0,1 - 0,2 m 2-ME-Lösung bzw. einer 0,01 - 0,02 m DTT- bzw. DTE-Lösung bei leicht alkalischem pH (7,0 - 8,6). Die verwendete Inkubationstemperatur liegt bei 37°C, Zimmertemperatur oder 4°C. Die Inkubationszeit schwankt zwischen 30 Minuten und 48 Stunden.

DTT bzw. DTE wird von manchen Autoren bei der partiellen Reduktion menschlicher Immunglobuline dem 2-ME vorgezogen, da die ersteren im Gegensatz zu 2-ME eine geringere Einwirkungszeit benötigen, in erheblich geringerer Konzentration angewendet werden (1/10) und außerdem geruchlos sind (PIROFSKY und ROSNER, 1974; OLSON et al., 1976). Die Wirksamkeit von 2-ME und DTT oder DTE ist bei den eben genannten Bedingungen bei den Immunglobulinen des Menschen praktisch gleich (PIROFSKY und ROSNER, 1974).

Mit Hilfe der milden Reduktion (von DEUTSCH und MORTON, 1957) war es möglich geworden, im Serum zwischen IgG- und IgM-Antikörpern zu unterscheiden. Diese unterschiedliche Resistenz der Immunglobuline gegenüber Reduktionsmitteln macht man sich u.a. in der Serologie bei der Antikörper-Titerbestimmung (landläufige Unterscheidung von 2-ME-sensitiven = IgM- und 2-ME-resistenten = IgG-Antikörpern) zunutze.

1.4. Problemstellung

LÖSCH et al. (1982) untersuchten die Immunglobuline genuin dysgammaglobulinämischer UM-B19 Hühner im Vergleich zu Kontrolltieren nach der Immunisierung. Sie fanden dabei in den Seren der mit *Brucella abortus* immunisierten Hühner bei den dysgammaglobulinämischen Tieren in der Brucellenagglutination 2-ME-resistente Antikörper, obwohl diese Tiere kaum nachweisbares IgG besaßen. Bei der Überprüfung der Klassenzugehörigkeit der gebildeten Antikörper konnten neben IgM- nur IgA-Antikörper nachgewiesen werden.

In der Literatur wird bei der milden Reduktion bzw. bei den Agglutinationstests nur zwischen 2-ME-resistenten (IgG) und 2-ME-sensitiven (IgM) Antikörpern unterschieden. Das Vorhandensein von IgA-Antikörpern wird dabei völlig unberücksichtigt gelassen.

Zu einer Klärung, was wirklich mit den Immunglobulinen des Huhnes unter den Bedingungen der Häm- und Brucellenagglutination geschieht, sollte die vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten.

Folgende Fragen sollten untersucht werden:

1. Welche Strukturveränderungen erfahren die Immunglobuline durch die Reduktion des Serums mit 2-ME
 - a) in der passiven Hämagglutination
 - b) in der Brucellenagglutination?

Welche Fragmente treten auf, ist noch eine immunologische Restaktivität (Antikörperbindungsfähigkeit) bei den einzelnen Immunglobulinen vorhanden?

2. Sind frühe Antikörper (d.h. Antikörper wenige Tage nach der Immunisierung) weniger resistent gegenüber 2-ME als späte (einige Wochen nach Immunisierung)?
Treten bei frühen Antikörpern nach der Reduktion andere Bruchstücke auf als bei späten?
3. Verhalten sich bei der Reduktion die Immunglobuline der dys- und normogammaglobulinämischen Hühner wie die der Kontrolltiere?

1.5. Literatur zur partiellen Reduktion der Immunglobuline

Phylogenetisch gesehen ist die Immunantwort ein gut eingespieltes System bei warmblütigen Vertebraten (Säugetieren und Vögeln), das in ähnlicher Form auch in kaltblütigen Wirbeltieren (Fischen, Amphibien, Reptilien) vorkommt.

So bildet z.B. das *Neunauge* (*Petromyzon marinus*) nach Immunisierung zwei spezifische Antikörper (6,6 S und 14 S), wobei der schwerere der beiden wahrscheinlich ein Aggregat des 6,6 S-Antikörpers ist. In diesen Immunglobulinen werden die H- und L-Ketten nicht durch Disulfidbrücken sondern nur durch nicht-kovalente Kräfte zusammengehalten (MARCHALONIS und EDELMAN, 1968).

Dagegen weisen die zwei Antikörper beim *Hai* (SIGEL und CLEM, 1965), beim *Goldfisch* und *Frosch* (UHR et al., 1962) sowie bei der *Schildkröte* (GREY, 1963b) bereits Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten auf. Beide Antikörper sind nach der obengenannten Literatur sensitiv gegenüber 2-Mercaptoäthanol, während beim *Hai* (CLEM und SMALL, 1967) und bei der *Schildkröte* (LESLIE und CLEM, 1972) nur der schwere Antikörper als 2-ME-sensitiv und der leichte als 2-ME-resistent beschrieben wurde.

Die Immunglobuline der warmblütigen Wirbeltiere sollen einzeln und ausführlicher dargestellt werden:

1. Immunglobulin IgG

Strukturelle Veränderungen

Das IgG-Molekül von *Mensch* und *Kaninchen* wird nach der milden Reduktion und Alkylierung in neutralen Puffern noch durch nicht-kovalente Kräfte zusammengehalten, auch wenn alle zwischenkettigen Disulfidbrücken gespalten sind (EDELMAN und POULIK, 1961; SOLHEIM und HARBOE, 1972),

während beim IgG des *Huhnes*, des *Fasans* und der *Wachtel* unter gleichen Bedingungen etwa 35 % (LESLIE und BENEDICT, 1969) bzw. beim IgG des *Huhnes* etwa 50 % (DREESMAN und BENEDICT, 1965a) der IgG-Moleküle dissoziieren, d.h. in H- und L-Ketten zerfallen.

Aktivitätsänderungen

Beim IgG des *Menschen* (CHAN und DEUTSCH, 1960; ISHIZAKA et al., 1965a; REESINK et al., 1972; PIROFSKY und ROSNER, 1974 und andere) und des *Kaninchens* ((ROBBINS et al., 1965) treten nach Behandlung mit Reduktionsmitteln keine Änderungen in der Agglutinationsaktivität auf, aber die Komplementbindungsfähigkeit sinkt beim IgG des *Menschen* (WIEDERMANN et al., 1963).

Bei der *Ente* (GREY, 1963a) und beim *Huhn* (BENEDICT et al., 1962, 1963; ROSENQUIST und GILDEN, 1963; SZENBERG et al., 1965; SCHRAM et al., 1971; GILLETTE, 1974) wurde eine teilweise bis völlige Inaktivierung der Agglutinations- und Präzipitationseigenschaften des IgG des *Huhnes* nach Behandlung mit 2-ME beschrieben. UHR et al. (1962) fanden nur eine geringe Reduktion der neutralisierenden Aktivität und BRÜGGEMANN et al. (1971) nur eine geringe Verminderung der Agglutinationsaktivität der 7S-Fraktion des *Huhnes* durch die Einwirkung von 2-ME. DELHANTY und SOLOMON (1966) stellten fest, daß das IgG des *Huhnes* in der Agglutination 2-ME-resistent ist.

Das IgG von *Rind* (MURPHY et al., 1965) und *Maus* (ADLER, 1965) wird durch partielle Reduktion in seinen Präzipitations-, Agglutinations- und Komplementfixierungseigenschaften geschädigt, nicht aber in seinen Antigenbindungsfähigkeiten.

Bei der *Ente* sinkt die Antigenbindung des IgG nach Behandlung mit 2-ME nur wenig (GREY, 1967), aber beim *Huhn* wurden nach Reduktion von reinem IgG nur noch 20 - 40 % der ursprünglichen Bindungsaktivitäten - gemessen im Farr-Test - gefunden (ROSENQUIST und GILDEN, 1963).

Bei *humanen* IgG-Antikörpern gegen doppelsträngige DNA fanden AARDEN et al. (1977) in der Immunfluoreszenztechnik keinen Effekt auf den Titer durch die Reduktion mit DTE und 2-ME, aber im Farr-Test eine sechsfache Zunahme der DNA-Bindung. Dies führten die Autoren auf eine erhöhte Beweglichkeit des IgG-Moleküls nach der Spaltung von Disulfidbrücken zurück. Diese durch die Spaltung der kovalenten Bindungen zwischen den H-Ketten erhöhte Flexibilität des IgG-Moleküls wurde auch von VENYAMINOV et al. (1976) für das IgG des *Menschen*, von CHAN und CATHOU (1977) für das IgG des *Kaninchens* und von JACKSON et al. (1983) für das IgG der *Maus* beschrieben.

2. Immunglobulin IgM

Strukturveränderungen

Bei der Reduktion des IgM des *Menschen* (DEUTSCH und MORTON, 1957; MILLER und METZGER, 1965a; CHESEBRO et al., 1968; BEALE und FEINSTEIN, 1969) und des *Hundes* (VAERMAN und HEREMANS, 1969) entstehen monomere Untereinheiten bestehend aus zwei H- und zwei L-Ketten, die bei 7 S sedimentieren. Beim *Menschen* besitzen diese Untereinheiten ein MG von etwa 160.000 (DEUTSCH und MORTON, 1958; CHAN und DEUTSCH, 1960).

Eine völlig andere Struktur der monomeren Untereinheit des IgM des *Menschen* beschrieben SUZUKI und DEUTSCH (1967). Für sie besteht die reduzierte Untereinheit (8 S) aus drei L- und zwei H-Ketten. Bei der Alkylierung gehen zwei L-Ketten pro Untereinheit verloren, was zu einer bei 7 S sedimentierenden Untereinheit aus einer L- und zwei H-Ketten führt.

Beim *Huhn* wurden nach der Reduktion des IgM 7S-Untereinheiten gefunden (BENEDICT et al., 1962), aber auch 5S-Formen bestehend aus einer H- und einer L-Kette sowie freie L-Ketten. In neutralen Puffern fand ohne dispergierende Substanzen (z.B. Harnstoff) eine teilweise Dissoziation in H- und L-Ketten statt (BENEDICT, 1967).

Aktivitätsänderungen

In der Hämagglutination fällt der Titer nach Behandlung des *menschlichen* IgM mit Reduktionsmitteln stark ab (ISHI-ZAKA et al., 1965a) bzw. es kommt zum völligen Verlust der Agglutinationsaktivität (CHAN und DEUTSCH, 1960; JACOT-GUILLARMOD und ISLIKER, 1962; PIROFSKY und ROSNER, 1974; OLSON et al., 1976 und andere). Ähnliche Ergebnisse liegen über die Reduktion des IgM beim *Kaninchen* vor (ROBBINS et al., 1965; ONOUE et al., 1965b).

Beim *Huhn* wird die Agglutinations-, Präzipitations- und Neutralisierungsaktivität des IgM durch Reduktion vollständig zerstört (BENEDICT et al., 1962; FRANKLIN, 1962; UHR et al., 1962; BENEDICT et al., 1963; ROSENQUIST und CAMPBELL, 1966; LESLIE und BENEDICT, 1968 und andere), während beim IgM des *Schweines* die Spaltung der Disulfidbrücken zwischen den H-Ketten nur wenig Wirkung auf die Aktivität (Häm- und Salmonellenagglutination, Komplement-

bindung) hat, solange eine pentamere Molekülstruktur erhalten bleibt (BEALE und KENT, 1977). Das Zusammenhalten der Ketten durch nicht-kovalente Kräfte ist stärker ausgeprägt als beim IgM des Menschen (BEALE, 1974).

JACOT-GUILLARMOD und ISLIKER (1962) stellten fest, daß die Untereinheiten des *menschlichen* IgM nicht mehr agglutinieren können, daß sie aber noch fähig sind, sich spezifisch an das Antigen zu binden. Zum gleichen Ergebnis kamen auch CHAN und DEUTSCH (1960) und CHAVIN und FRANKLIN (1969) für das IgM des *Menschen* und ONOUE et al. (1965a, 1965b) für das IgM des *Kaninchens*.

3. Immunglobulin IgA

Über die Reduktion des Serum-IgA gibt es erheblich weniger Literatur als über IgG und IgM. Die meisten Untersuchungen wurden mit sekretorischem IgA durchgeführt.

Hier sollen nur die Veränderungen des Serum-IgA dargestellt werden:

Strukturveränderungen

Bei der Reduktion von Serum-IgA des *Menschen* (ROCKEY und KUNKEL, 1962; ISHIZAKA et al., 1965a), des *Hundes* (VAERMAN und HEREMANS, 1969), der *Maus* (FAHEY, 1961) und des *Huhnes* (LESLIE und MARTIN, 1973) entstehen monomere Untereinheiten (7S). Diese Monomeren sind beim *Huhn* durch nicht-kovalente Kräfte miteinander verbunden (LESLIE und MARTIN, 1973).

Aktivitätsänderungen

Die Agglutinationsaktivität des IgA des *Menschen* wird durch die Behandlung mit Reduktionsmitteln merklich erniedrigt (ISHIZAKA et al., 1965a) bzw. völlig zerstört (ROCKEY und KUNKEL, 1962).

Das IgA des *Huhnes* ist in der Agglutination zumindest partiell 2-ME-resistent (DELHANTY und SOLOMON, 1966; LÖSCH et al., 1982).

4. Unterschiedliche 2-ME-Resistenz bei frühen und späten Antikörpern

ROSENQUIST und CAMPBELL (1966) beschrieben für die Immunglobuline des *Huhnes*, besonders des IgG, eine Erhöhung der 2-ME-Resistenz im Lauf der Immunisierung.

ADLER (1965) fand das gleiche Phänomen beim IgG der *Maus*.

2. Material und Methoden

2.1. Tiermaterial

Als Versuchstiere wurden adulte Hühner beiderlei Geschlechts aus folgenden Gruppen genommen:

1. Als Kontrolltiere immunologisch intakte Heisdorf-Nelson-Lohmann-Hühner.
2. Normogammaglobulinämische UM-B19 Hühner mit einem Serum-Immunglobulinmuster, das fast der Norm entspricht, d.h. die IgG- und IgM-Konzentrationen sind normal, die IgA-Spiegel können leicht erhöht sein.
3. Dysgammaglobulinämische UM-B19 Hühner mit verändertem Serum-Immunglobulinmuster. Bei ihnen liegen erhöhte IgM- und IgA-Konzentrationen bei stark erniedrigten bzw. nicht mehr nachweisbaren IgG-Konzentrationen vor.

Die normo- und dysgammaglobulinämischen Tiere entstammen einer Hühnerlinie, die im hiesigen Institut herausgezüchtet wurde, und die bezüglich des Histokompatibilitätslocus homozygot ist (B19B19). Sie wurde "UM-B19 Linie" genannt, wobei "UM" für Universität München steht (FIEDLER et al., 1980).

Die Tiere wurden alle unter den gleichen Bedingungen in kleinen Gruppen auf Gitterrosten gehalten; sie erhielten pelletiertes Legehennenalleinfutter und Trinkwasser ad libitum.

2.2. Antigene

Die Immunisierung erfolgte mit:

Humanserumalbumin (HSA)

(Human Albumin, Behringwerke AG, Marburg/Lahn)

Brucella abortus (B.abortus)

(lyophilisiertes Brucella-Antigen, B. abortus, Biotyp I, Stamm 1119-3 USDA, S-Form, das freundlicherweise vom Robert-von-Ostertag Institut des Bundesgesundheitsamtes Berlin zur Verfügung gestellt wurde)

2.3. Immunisierung

Die Tiere wurden am Tag t_0 immunisiert und am 28. Tag geboostert.

Die Immunisierung wurde mit *HSA* und *Brucellen* gleichzeitig durchgeführt, da LÖSCH et al. (1982) festgestellt hatten, daß Kontrollhühner auf die Immunisierung mit dem thymusabhängigen Antigen HSA mit einer hohen IgG-Antwort, dysgammaglobulinämische Hühner ausschließlich mit IgM-Antikörpern reagierten.

Die Immunisierung mit dem thymusunabhängigen Antigen *B. abortus* wurde von den Kontrolltieren mit einer Steigerung besonders der IgM-Antikörper, von den dysgammaglobulinämischen Tieren mit IgM- und 2-ME-resistenten = IgA-Antikörpern beantwortet.

Um in einer Serumprobe sowohl eine erhöhte Menge an IgG- und IgM- als auch an IgA-Antikörpern bei allen Tiergruppen zu erreichen, wurde mit beiden Antigenen gleichzeitig immunisiert.

Das lyophilisierte *Brucellenantigen* wurde in einer Konzentration von 10^{10} Organismen/ml ($\hat{=}$ 0,95 mg lyophilisiertes Antigen pro ml; die Konzentration des Antigens wurde uns vom Robert-von-Ostertag Institut, Berlin, mitgeteilt) in steriler physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Dazu wurden 40 mg HSA/ml gegeben und kurz geschüttelt.

Die Injektion erfolgte bei beiden Immunisierungen in den *Musculus gastrocnemius* in einer Dosierung von 10^{10} *Brucellen* und 40 mg HSA pro kg Körpergewicht.

2.4. Entbluten der Hühner und Serumgewinnung

Die Tiere wurden unter Äthernarkose durch Herzpunktion entblutet.

Das so gewonnene Blut wurde 45 Minuten bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Nach Zentrifugation für zehn Minuten bei 2000 g wurde das Serum abpipettiert und dann sofort in Polystyrolröhrchen bei -40°C bis zur Weiteruntersuchung eingefroren.

2.5. Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen mittels der Rocket-Immunelektrophorese (LAUREL, 1966)

Bei dieser Technik wird das Antiserum (Antikörper) gegen ein bestimmtes Immunglobulin vor der Elektrophorese in die gleichmäßig dicke Agargelschicht inkorporiert und in eingestanzte Löcher eine bestimmte Menge des zu untersuchenden Serums (Antigen) pipettiert. Das im elektrischen Feld gegen die Anode wandernde Antigen bildet mit den Antikörpern ein konisch geformtes Präzipitat ("Rocket"), das nach Färbung gut auswertbar ist. Der Ab-

stand zwischen der Präzipitatfront und dem Loch ist proportional zur Antigenkonzentration, d.h. zur Immunglobulinkonzentration im zu untersuchenden Serum.

2.6. Bestimmung der Agglutinationstiter

Zur quantitativen Messung von Antikörpern bedient man sich eines relativen Maßes - des Titers - um die Antikörperaktivität eines Antiserums zu erfassen. Diese setzt sich im wesentlichen aus zwei Größen zusammen, nämlich der Antikörperkonzentration und dem Durchschnitt der Affinität (Bindungsstärke von Antikörpern mit Antigenen). Man muß sich deshalb bewußt sein, daß der gleiche Titer sowohl durch eine relativ hohe Konzentration von Antikörpern schwacher Affinität als auch durch eine relativ geringe Konzentration an Antikörpern großer Affinität erreicht wird (v.FELLENBERG, 1978). Der Titer wird mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des Antiserums bestimmt, alle Verdünnungen werden durch Zugabe einer konstanten Menge an Antigen auf ihre Antikörperaktivität geprüft. Die Endverdünnung, die noch gerade eine positive Reaktion erkennen läßt, wird als eine (willkürliche) Einheit definiert. Das unverdünnte Serum enthält somit so viele Einheiten wie die Endverdünnung beträgt (reziproker Wert der Endverdünnung). Die Anzahl dieser Einheiten wird als *Titer* bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Titer als negativer Logarithmus zur Basis 2 der betreffenden Verdünnungsstufe angegeben.

$-\log_2 \text{Titer}$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Serumver- dünnung	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	$\frac{1}{2048}$	$\frac{1}{4096}$

Die Agglutinationstiter gegen HSA wurden mit Hilfe der passiven Hämagglutination, die gegen *Brucella abortus* mit der direkten Brucellenagglutination bestimmt.

Agglutination bedeutet in diesem Zusammenhang die Zusammenballung suspendierter Zellen oder Partikel durch Antikörper. Dabei werden genügend Antigen-Antikörper-Brücken ausgebildet, die die natürliche Abstoßung von Zellen oder Partikeln überwinden, was zur Agglutination führt. Die Valenz des Antigens und die Natur der Antikörper sind hier wichtig. Zellen mit wenigen antigenen Determinanten werden weniger agglutiniert als solche mit vielen. Das multivalente IgM ist auf molekularer Basis ein wirksamerer Agglutinationsantikörper als das divalente IgG (ONOUE et al., 1965 b).

Die Agglutination unterscheidet zwischen 2-ME-resistenten (IgG) und 2-ME-sensitiven (IgM) Antikörpern.

1. Passive Hämagglutination

Da HSA mit den Antikörpern keine Agglutinate bildet, nimmt man die passive Hämagglutination zur Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Komplexe zu Hilfe. Bei der passiven Hämagglutination werden Erythrozyten in Antigenträger umgewandelt, indem an ihre Oberfläche fremde Antigene gebunden werden. Damit können sie mit

den Antikörpern agglutinieren, d.h. es kommt zur Brückenbildung und damit zur Verklumpung der Erythrozyten, und die Reaktion kann ohne weitere Hilfsmittel abgelesen werden. Da die Erythrozyten die Antigen-Antikörper-Reaktion nur passiv anzeigen, heißt diese Methode "passive Hämagglutination".

a) Erythrozytenkopplung

(modifiziert nach AVRAMEAS et al., 1969)

Von einem gesunden Schaf wurde unter sterilen Bedingungen Blut gewonnen. Es folgte eine Zentrifugation (zehn Minuten bei 2000 g), um die Erythrozyten von den Leukozyten und vom Plasma abzutrennen. Danach wurden die Erythrozyten dreimal mit phosphatgenuffelter Saline (PBS), pH 7,4, gewaschen, dabei jeweils zehn Minuten bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dann wurden 80 ml PBS und 4 ml gepackte Erythrozyten vorsichtig gerührt, langsam 10 ml 2,5 %ige Glutaraldehydlösung zugegeben und 15 Minuten weiter gerührt. Nach Zugabe von 200 mg HSA (20 ml einer einprozentigen HSA-PBS-Lösung) wurde 2 1/2 Stunden gerührt. Danach wurde die Lösung zehn Minuten bei 2000 g zentrifugiert und wieder dreimal mit PBS gewaschen.

Für die Hämagglutination wurde dann eine 2 %ige Erythrozytensuspension (in PBS) hergestellt.

b) Durchführung der Hämagglutination

Zuerst wurden die Serumproben im Wasserbad für 30 Minuten auf 56°C erhitzt zur Inaktivierung des Komplements, das nach Antigen-Antikörper-Reaktion zur Hämolyse führen würde.

Die Hämagglutination wurde in Mikrotiterplatten mit V-förmigen Löchern (Fa. Greiner) durchgeführt.

Zur 2-ME-Inaktivierung wurden in Lochreihe 2 je 25 μ l 0,2 m 2-ME und 25 μ l Serumprobe eingefüllt und die Platten 90 Minuten bei 37°C inkubiert.

Danach wurden die restlichen Löcher mit je 25 μ l PBS beschickt und mit dem Mikrotitrator eine geometrische 1:2 Verdünnungsreihe hergestellt.

Bei den Platten ohne 2-ME-Inaktivierung wurden zuerst in alle Kavitäten 25 μ l PBS vorpipettiert und dann in Reihe 2 das Serum (25 μ l) dazugegeben. Anschließend wurde wieder eine geometrische 1:2 Verdünnungsreihe hergestellt.

Zuletzt wurden in jede Kavität (mit oder ohne 2-ME) je 25 μ l der Erythrozytensuspension eingefüllt und die Platten zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach einer ersten Ablesung kamen die Platten für 18 Stunden in den Kühlschrank und danach erfolgte die endgültige Titerablesung.

Die erste Lochreihe diente zur Erkennung einer eventuellen Spontanagglutination.

Positive und negative Kontrollen wurden jeweils mitgeführt.

2. Direkte Brucellenagglutination

Da die Agglutination der Antikörper mit dem Antigen, den Brucellen, bei Färbung ohne Hilfsmittel sichtbar ist, kann eine direkte Agglutination zur Bestimmung des Titers gemacht werden.

Durchführung (nach GAULTNEY et al., 1971)

Als Antigen diente das lyophilisierte *B. abortus*-Antigen. 9,5 mg dieser Trockensubstanz wurden in 1 ml PBS gelöst ($\approx 10^{11}$ Organismen/ml) und die Lösung mit Bromphenolblau (0,0001 g/ml) gefärbt.

Die Komplement- und 2-ME-Inaktivierung sowie die Beschickung der Platten wurden wie bei der Hämagglutination beschrieben durchgeführt, nur daß statt der Erythrozytensuspension jetzt die Brucellenlösung zugegeben wurde.

Nach dem Füllen der Kavitäten mit der Brucellenlösung wurden die Platten sofort für 24 Stunden bei 37°C und anschließend für zwei Stunden bei 4°C gehalten. Danach wurden die Titer abgelesen.

2.7. Mercaptoäthanol-Behandlung der Seren vor Ansatz des ELISA und der Affinitätschromatographie

Das 2-ME wurde immer in PBS, pH 7,4, verdünnt.

Es wurden zwei verschiedene 2-ME-Behandlungen der Seren durchgeführt.

a) Behandlung wie bei der passiven Hämagglutination

Gleiche Volumina Serum und 0,2 m 2-ME (z.B. je 25 µl) wurden 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die gleiche Menge (25 µl) PBS dazugegeben und die Probe zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wurde sie für 18 Stunden bei 4°C aufbewahrt und dann untersucht.

Diese Behandlung entspricht der passiven Hämagglutination, bei der die Erythrozyten in dem später zugegebe-

nen PBS suspendiert sind. Diese Behandlung wird in der Arbeit als *Methode 'A'* bezeichnet.

b) Behandlung wie bei der direkten Brucellenagglutination

Gleiche Mengen Serum und 0,2 m 2-ME (z.B. je 25 μ l) wurden 90 Minuten bei 37°C inkubiert, dann die gleiche Menge (25 μ l) PBS zugegeben, die Probe 24 Stunden bei 37°C und anschließend zwei Stunden bei 4°C gehalten und dann untersucht.

Diese Behandlung ist die gleiche wie bei der direkten Brucellenagglutination, bei der das Brucellenantigen im PBS gelöst ist. Sie wird als *Methode 'B'* bezeichnet.

Bei beiden 2-ME-Behandlungen wurden also gleiche Volumina Serum und 0,2 m 2-ME (Endkonzentration an 2-ME demnach 0,1 m) für 90 Minuten bei 37°C inkubiert und nach Zugabe des gleichen Volumens PBS (Endkonzentration des 2-ME jetzt 0,066 m) erfolgten unterschiedliche Aufbewahrungsbedingungen bei der Häm- und der Brucellenagglutination. Obwohl die meiste Zeit der Inkubation des Serums mit einer Konzentration des 2-ME von 0,066 m stattfindet, wird in den nachfolgenden Ausführungen von einer Reduktion der Immunglobuline im Serum mit 0,1 m 2-ME gesprochen.

2.8. Enzyme-linked Immunosorbent Assay = ELISA

(modifiziert nach ENGVALL und PERLMANN, 1972)

Der Antikörpernachweis geschieht hierbei nach dem "Sandwich"-Prinzip mit Hilfe enzymmarkierter Antikörper gegen die Immunglobuline im Serum. Die Meßgröße ist indirekt und besteht im Substratumsatz des Enzyms.

Rein schematisch läuft folgende Reaktion ab:

Das Antigen wird an Micro-ELISA-Platten adsorbiert. Dazu wird das zu untersuchende Serum gegeben. Bei Vorhandensein von spezifischen Antikörpern im Serum kommt es zur Antigen-Antikörper-Reaktion, die nicht sichtbar ist. Deshalb fügt man mit einem Enzym gekoppelte Antikörper gegen die Serum-Immunglobuline (polyspezifisches Antiserum) oder gegen die Serum-Immunglobulinklassen (monospezifisches Antiserum) hinzu. Hat vorher eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden, so kann es jetzt zur Bindung der Enzym-Antikörper mit den IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern im Antigen-Antikörper-Komplex kommen. Ein nun zugegebenes Substrat wird mit Hilfe des Enzyms in ein farbiges Reaktionsprodukt umgesetzt. Die Reaktion wird nach einer definierten Zeit gestoppt, um vergleichbare Werte zu erhalten. Die Farbintensität ist ein Maß für die Menge an gebundenem Enzym und damit an Antikörpern im Serum. Sie wird photometrisch gemessen.

a) Lösungen und Puffer

1. Natrium-Carbonat-Puffer pH 9,6, zur Beschichtung der ELISA-Platten

8,37 g Na-Carbonat-10-Hydrat

6,00 g Na-Hydrogencarbonat

0,20 g Na-Azid

ad 1 l aqua bidest

2. PBS-Tween

0,05 % Tween 20 in PBS (pH 7,4)

3. Substratlösung

2 mg p-Nitrophenylphosphat (Fa. Serva, Heidelberg) wurden pro ml AMP-Puffer (2-Amino-2-methyl-1-propanol-Puffer der Fa. Sigma, München, 1:10 verdünnt) gelöst.

b) Antigengewinnung

HSA ist ein lösliches Antigen und brauchte daher nur im Na-Carbonat-Puffer (100 µg HSA/ml Puffer) gelöst zu werden.

Brucella abortus Antigen wurde nach der Methode von MYERS und SINIUK (1970) gewonnen. Die Brucellentrocken-substanz wurde in PBS gelöst und 20 Minuten mit Ultraschall behandelt. Nach Zugabe von 0,5 % Tween 80 wurde die Lösung eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt, dann 15 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert. Der opaleszierende Überstand enthielt das Antigen.

Diese Flüssigkeit wurde über Nacht bei 4°C gegen den Na-Carbonat-Puffer dialysiert und dann mit Hilfe der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) eine Konzentration von 100 µg Antigen/ml Na-Carbonat-Puffer eingestellt.

c) Durchführung des ELISA

Die Micro-ELISA-Platten (Fa. Dynatech, Denkendorf) wurden mit dem Antigen beschichtet, indem in jede Kavität 200 µl der HSA- oder Brucellenlösung eingefüllt wurden, die Platten drei Stunden rotierend bei 37°C und danach über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gehalten wurden.

Zur Bestimmung der ELISA-Titer wurden die Platten dreimal mit PBS-Tween gewaschen zur Entfernung des nicht gebundenen Antigens.

In die Reihen 3 - 12 wurden je 50 µl PBS-Tween vorpipettiert. In Reihe 2 wurden in die Kavitäten, in die Originalserum kommen sollte, je 90 µl PBS-Tween eingefüllt und 10 µl Serum aus dem Pool zugegeben.

In die anderen Löcher kamen 70 µl PBS-Tween und je 30 µl von der nach Seite 29/30 (Methode 'A' bzw. 'B')

mit 2-ME behandelten Probe (= 10 μ l Serum + 10 μ l 2-ME + 10 μ l PBS). Mit einem Mikrotitrator wurde eine geometrische 1:2 Verdünnungsreihe hergestellt und die Platten dann 90 Minuten bei 37°C rotierend inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal mit PBS-Tween gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen.

Danach wurden in jede Kavität 100 μ l eines monospezifischen Anti-Hühner-Immunglobulin-Enzymkonjugats gefüllt, das wie bei STORANDT (1983) hergestellt wurde. Das Konjugat wurde bei HSA als Antigen in einer Verdünnung von 1:100, bei Brucellen-Antigenen von 1:50 (mit PBS-Tween) verwendet. Eine Inkubation von 90 Minuten bei 37°C unter Rotation schloß sich an und danach dreimaliges Waschen mit PBS-Tween zur Entfernung des nicht gebundenen Konjugats.

Dann wurden je 200 μ l der Substratlösung in jede Kavität pipettiert. Nach 15 Minuten (bei IgA nach 20 Minuten) wurde die Farbreaktion mit 50 μ l 1 n Natronlauge gestoppt und die Extinktion jeder Kavität mit einem automatischen Photometer (Multiscan, Fa. Flow, Meckenheim)^x bei 405 nm gemessen. Als Nullpunkt diente die Reihe 1.

Positive und negative Kontrollen wurden jeweils mitgeführt.

d) Auswertung der Ergebnisse

Als Titer wurde diejenige Verdünnungsstufe angegeben, bei der eine Extinktion von 0,1 gemessen wurde. Diese Werte lagen im linearen Bereich der Extinktionskurven. Der Titer wurde als negativer Logarithmus zur Basis 2 der betreffenden Verdünnungsstufe angegeben, wobei die Verdünnung des Serums mit PBS-Tween im Verhältnis 1:10 als unverdünnte Lösung und hier als Titerstufe 1 angegeben wurde.

x = für die Benutzung des Photometers wird Herrn Prof. Bachmann (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin) sehr herzlich gedankt.

-log Titer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Serumver- dünnung	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$

2.9. Affinitätschromatographie an Sepharose 4B

Zur Isolierung spezifischer Antikörper aus Serumproben verwendet man die Affinitätschromatographie (LOWE und DEAN, 1974). Hierbei wird das bestimmte Antigen (z.B.HSA) an die bromcyanaktivierte Sepharose (unlösliche Matrix) gekoppelt. Beim Durchlauf der Serumprobe reagieren die spezifischen Antikörper mit dem unlöslichen Antigen und werden daran gebunden. Die nicht reagierenden Proteine erscheinen im Wascheluat. Zur Dissoziation der Antigen-Antikörper-Brücken wird mit einem Glycin-HCl-Puffer der pH auf 2,5 erniedrigt und man kann die spezifischen Antikörper in Reinform im Eluat auffangen.

a) Lösungen und Puffer

1. Kopplungspuffer 0,2 m, pH 8,3

5,6 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$

15,0 g NaHCO_3

29,2 g NaCl

ad 1 l aqua bidest

2. Startpuffer 0,1 m, pH 7,0

5,6 g KH_2PO_4

21,0 g Na_2HPO_4

14,6 g NaCl

0,2 g Na-Azid

5 ml Tween 80 100 μg

ad 1 l aqua bidest

3. *Glycin* 0,2 m, pH 8,0

15 g Glycin
ad 1 l aqua bidest

4. *Elutionspuffer* 0,1 m, pH 2,5

7,5 g Glycin
29,2 g NaCl
ad 1 l aqua bidest

5. *Acetatpuffer* 0,1 m, pH 4,0

1,36 g Na-Acetat (CH_3CONa)
834 ml 0,1 n Essigsäure (CH_3COOH)
29,2 g NaCl
ad 1 l aqua bidest

6. *Tris-HCl-Puffer* 0,2 m, pH 8,5

6,06 g Tris
29,2 g NaCl
ad 1 l aqua bidest

b) *Herstellung der aktivierten Sepharose und Antigenkopplung*

Die Sepharose 4B (Fa. Pharmacia, Uppsala) wurde mit etwa dem zehnfachen Volumen an bidestilliertem Wasser auf einem Büchnertrichter gewaschen, dann trockengesaugt und 25 g davon abgewogen (ergibt ca. 50 g gepacktes Gel). Diese wurden mit einem Ansatz von 24 ml 2,5 m Kaliumphosphatpuffer, 11 ml Wasser und 20 ml BrCN-Dioxan (Endkonzentration an BrCN betrug 5 mg/ml) für zwölf Minuten bei 5 - 10°C unter dem Abzug inkubiert. Dabei wurde vorsichtig gerührt. Anschließend wurde die Aktivierung mit 750 ml 0,1 m Na_2CO_3 im Büchnertrichter abgestoppt, was innerhalb von 90 Sekunden bei 0°C erfolgen sollte. Danach wurde das Gel wieder trockengesaugt.

Dann wurde das Antigen an die aktivierte Sepharose gekoppelt. Dazu wurden 5 mg HSA pro ml Kopplungspuffer gelöst und die Sepharose in die Antigenlösung (50 ml) übergeführt. Bei 4°C wurde nun drei Stunden vorsichtig gerührt.

Danach wurde die Flüssigkeit im Büchnertrichter abgesaugt, das Gel in 0,2 M Glycin, pH 8,0, aufgenommen (500 ml) und bei Zimmertemperatur für vier Stunden am Rotationsverdampfer gerührt. Nach dem Absaugen der Flüssigkeit wurde das Gel fünfmal abwechselnd mit Kopplungs- und Acetatpuffer gewaschen. Anschließend wurde mit viel Startpuffer nachgewaschen und das Gel bei 4°C darin aufbewahrt.

c) Isolierung der Antikörper

Zur Isolierung der HSA-Antikörper wurde das Gel in die Säule gefüllt (Fa. Pharmacia, Uppsala). Die *unbehandelte Serumprobe* wurde über Nacht bei 4°C gegen Startpuffer dialysiert, 15 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert und der Überstand auf die mit Startpuffer gewaschene Säule aufgetragen.

Das erste Wascheluat wurde aufgefangen und mit Hilfe des ELISA auf noch vorhandene HSA-Aktivität geprüft. Nach dem Nachwaschen der Säule mit dem dreifachen Volumen an Startpuffer wurden die Antikörper mit Elutionspuffer pH 2,5 wieder vom am Gel gebundenen Antigen abgegeben. Das Eluat wurde in 20 Fraktionen zu je 1,5 ml aufgefangen und sein pH mit in Elutionspuffer gelöstem Tris sofort in den neutralen bzw. leicht alkalischen pH-Bereich gebracht, da die Antikörper als Proteine bei saurem pH denaturieren.

Die Fraktionen wurden im Photometer bei 280 nm im UV-Licht gemessen. Als Leerwert diente die Fraktion 20. Ab Fraktion 3 - 5 trat ein Gipfel in der Extinktionskurve auf. In den Fraktionen unter diesem Peak befanden sich die Antikörper.

Zur Isolierung der mit 2-ME reduzierten Antikörper wurde jede nach Seite 29/30 (Methode 'A' bzw. 'B') mit 2-ME vorbehandelte Serumprobe (z.B. 5 ml Serum + 5 ml 0,2 M 2-ME + 5 ml PBS) 15 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert, der Überstand mit der gleichen Menge (15 ml) Startpuffer verdünnt und wie oben beschrieben auf die Säule aufgetragen und eluiert.

Da die Konzentration der Antikörper bzw. Antikörperbruchstücke im Eluat zu gering war (Proben hinterließen keine Banden im SDS-Gel, s.u.) wurden alle Fraktionen eines Peaks zusammengefaßt und im Dialysierschlauch (Visking Dialysierschlauch 20/32; Fa. Serva, Heidelberg) in reinem Polyäthylenglykol 20.000 (Fa. Serva) auf ca. 0,5 ml eingengt. Mit diesen Proben wurde dann die SDS-PAGE (s.u.) durchgeführt.

Nach jedem Lauf wurde das Gel der Affinitätssäule mit Acetatpuffer und danach Tris-HCl-Puffer regeneriert und mit Startpuffer nachgewaschen.

2.10. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese = SDS-PAGE (modifiziert nach LAEMMLI, 1970)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden die Serumproteine unter Gleichschaltung der Nettoladungsdifferenzen in alleiniger Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht getrennt. Das Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) stellt ein bipolares Detergent dar, das sich mit seinem hydrophoben Ende an entsprechende Seitenketten von Eiweißmolekülen anlagert, während seine ionisierbaren Sulfatreste ins Lösungsmittel ragen. Dadurch kommt es zu einer Umhül-

lung der Proteinmoleküle mit einem stark negativen SDS-Mantel, der intermolekulare Ladungsunterschiede überlagert. Während der elektrophoretischen Trennung kommen somit nur noch die durch unterschiedliche Molekülgröße entstehenden Reibungswiderstände in Polyacrylamidgelen mit definierter Porengröße zum Tragen, woraus eine Trennung der Moleküle nach unterschiedlichen Molekulargewichten resultiert. Durch Färbung der Gele werden die Proteinbanden sichtbar gemacht und durch Mitlaufenlassen einer Eichproteinlösung kann das Molekulargewicht der Proteine berechnet werden (SHAPIRO et al., 1967; WARR, 1982).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *lineares Gradientengel* (3 - 15 %) verwendet, d.h. die Porengröße im Gel verkleinerte sich linear von oben nach unten. Bei normalen Polyacrylamidkonzentrationen (> 5 %) wandern große Moleküle ($MG > 6 \times 10^5$) nicht ins Gel, während bei niedrigen Konzentrationen kleine Moleküle unten aus dem Gel herauswandern. Bei einem Gel mit einem linearen Konzentrationsgradienten von Polyacrylamid sind Moleküle mit einem MG zwischen 900.000 und 18.000 gut getrennt darstellbar.

a) Lösungen und Puffer

1. Acrylamidlösung (30 %)

29,2 % Acrylamid

0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

0,01 mg Bromphenolblau / 100 ml

25,0 % Glycerin

2. Gelpuffer pH 8,8

1,5 m Tris-HCl (Δ 18,17 g/100 ml)

0,4 % SDS

3. *Probenpuffer* pH 8,8

10 % Glycerin

2,3 % SDS

0,0625 m Tris-HCl ($\hat{=}$ 0,76 g/100 ml)

4. *Elektrophoresepuffer* pH 8,3

0,025 m Tris ($\hat{=}$ 3,09 g/100 ml)

0,192 m Glycin ($\hat{=}$ 14,41 g/100 ml)

0,1 % SDS

5. *Färbelösung*

450 ml Äthanol 96%

100 ml Eisessig

450 ml aqua bidest

5 g Coomassie Brilliant Blue

6. *Entfärbelösung*

250 ml Äthanol 96 %

100 ml Eisessig

450 ml aqua bidest

7. *Ammoniumperoxodisulfat*

10 % Ammoniumperoxodisulfat

b) *Durchführung der SDS-PAGE*

Die Elektrophorese wurde auf 1,2 mm dicken Polyacrylamidgelen ausgeführt. Dazu wurde zwischen zwei senkrecht stehende Glasplatten (120 x 160 mm), die durch Plexiglasstäbe auf 1,2 mm Abstand gehalten wurden, ein Gradientengel gegossen. Pro Platte konnten dreizehn Proben getrennt werden.

Für das lineare Gradientengel wurde eine Gellösung mit einer Acrylamidkonzentration von 15 % und eine mit 3 % hergestellt,

Für die 15 %ige Lösung wurden 15 ml von der 30 %igen Acrylamidlösung, 7,5 ml aqua bidest, 7,5 ml Gelpuffer und 100 µl Ammoniumperoxodisulfat gemischt, dann wurde die Lösung etwa eine Minute mit der Wasserstrahlpumpe entgast und 15 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin; Fa. Serva, Heidelberg) zugegeben.

Die 3 %ige Lösung bestand aus 3 ml der 30 %igen Acrylamidlösung, 19,5 ml aqua bidest, 7,5 ml Gelpuffer, 100 µl Ammoniumperoxodisulfat und 15 µl TEMED.

Mit je 15 ml dieser beiden Lösungen wurde das Gradientenmischgerät gefüllt. Dieses ermöglicht eine lineare Mischung der beiden Lösungen beim Entleeren zwischen die zwei Glasplatten. Damit lag die Acrylamidkonzentration dann am untersten Rand des Gels bei 15 % und am obersten bei 3 %. Anhand des enthaltenen Bromphenolblau konnte man die gleichmäßige Zu- bzw. Abnahme der Konzentration des Acrylamids kontrollieren.

Durch einen "Kamm", der das Gel nach oben hin abschloß, entstanden 13 rechteckige Probentaschen (ca. 5 x 7 mm).

Anschließend wurde das Gel zur chemischen Polymerisierung, die durch Ammoniumperoxodisulfat und TEMED erfolgt, etwa zwei Stunden stehen gelassen.

Das unbehandelte Serum wurde mit dem Probenpuffer im Verhältnis 1:6 verdünnt, die nach Seite 29/30 (Methode 'A' bzw. 'B') mit 2-ME behandelten Proben im Verhältnis 1:1. Bei den Eluaten der Affinitätschromatographie wurde nach der Einengung eine Verdünnung mit dem Probenpuffer von 6:1 gewählt.

Von den verdünnten Serumproben (mit und ohne 2-ME) wurden dann je 30 µl in jede Probentasche des Gels gefüllt, von den verdünnten Eluaten je 60 µl.

Als Markersubstanzen wurden die Eichproteine (Rinderserumalbumin, Trypsininhibitor und RNA-Polymerase) aus der Combi-

thek (Fa. Boehringer, Mannheim) und reines IgG, IgM und IgA vom Huhn (gereinigt von Frau Dr. I. Schraner) verwendet.

Nach dem Auftragen der Proben und Markersubstanzen wurde bis zum Plattenrand mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Anschließend wurde die Elektrophorese 30 Minuten bei einer Stromstärke von 20 mA (zur Konzentrierung der Proben), danach mit 40 mA durchgeführt.

Der Lauf wurde beendet, wenn die Bromphenolblaufront den unteren Gelrand erreicht hatte, was nach etwa drei Stunden der Fall war.

Die Gele wurden für etwa 30 Minuten in der Färbelösung gefärbt, danach wurden sie über Nacht entfärbt und anschließend in Plastikbeutel eingeschweißt. Sie konnten darin gut aufbewahrt und ausgewertet werden.

c) Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptide

Zur Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptide wurde zu jedem Gel mit Hilfe der Markerproteine eine Eichgerade aufgestellt.

Die Markerproteine bestanden aus einem Trypsininhibitor mit einem MG von 21.500, Rinderserumalbumin (MG 68.000) und einer RNA-Polymerase aus drei Untereinheiten mit Molekulargewichten von 39.000, 155.000 und 165.000.

Zur Erstellung der Eichgeraden wurden die Wanderungsstrecken der einzelnen Banden der Eichproteine ab Gelanfang gemessen. Dann wurde auf halblogarithmischem Papier der Logarithmus der Molekulargewichte der Eichproteine (Ordinate) gegen die gemessenen Wanderungsstrecken (Abszisse) aufgetragen.

Die Bestimmung der Molekulargewichte der Immunglobuline und ihrer Fragmente erfolgte dann dadurch, daß zunächst von den durch Ausmessen der entsprechenden Wanderungsstrecken der Polypeptide erhaltenen Punkte der Abszisse aus das Lot auf die Eichgerade gefällt wurde. Mit Hilfe einer diesen Punkt schneidenden Parallele zur X-Achse konnte dann an der Ordinate das Molekulargewicht des zu definierenden Proteins abgelesen werden.

2.11. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in Kombination mit Zweidimensionaler Immunelektrophorese (PAGE-CIEP)

Die Zweidimensionale Immunelektrophorese eignet sich zur qualitativen Analyse von Antigengemischen. Die Durchführung der PAGE-CIEP erfolgt, wie bei der einfachen Zweidimensionalen Immunelektrophorese (CIEP) in zwei Schritten, nur daß bei der hier angewandten Methode die elektrophoretische Auftrennung der einzelnen Proteine im SDS-PAGE durchgeführt wird und die anschließende Immunelektrophorese in der senkrechten Richtung zum ersten Lauf in Agarose abläuft, der SDS und mono- bzw. polyspezifisches Antiserum zugesetzt wurden.

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß

1. durch die elektrophoretische Auftrennung der Probe im SDS-Gel die Molekulargewichte der Polypeptide bestimmt werden können und
2. durch die monospezifischen Antiseren bei der PAGE-CIEP die Zugehörigkeit der Proteinbanden des SDS-Gels zu den einzelnen Immunglobulinen geprüft werden kann.

Durchführung

Nach Auftrennung der Proteinmischung (Serum oder Eluat aus der Affinitätschromatographie) durch SDS-PAGE wurde ein 5 mm breiter Streifen des Polyacrylamidgels (parallel zur Elektrophoreselaufrichtung) abgetrennt und auf die noch halbflüssige Agarose L (Fa. LKB; 1 %ige Agarose L in 1:5 verdünntem Tris-Barbiturat-Puffer, pH 8,6) auf 10 x 10 cm Glasplatten gelegt. Die Agarose (15 ml) enthielt mono- bzw. polyspezifisches Antiserum gegen Hühnerimmunglobuline in einer Konzentration, die zwischen 2 und 20 % variiert wurde. Das Antiserum wurde, wie bei WANKE (1982) beschrieben, hergestellt. Außerdem wurde der Agarose noch SDS in einer Konzentration von 0,01 % hinzugefügt.

Nach fünfminütiger Diffusion wurde die Elektrophorese in zum Lauf der SDS-PAGE senkrechter Richtung bei 1 - 2 V/cm 16 Stunden lang durchgeführt.

Der Elektrophoresepuffer bestand aus 1:4 verdünntem Tris-Barbiturat-Puffer, pH 8,6, ohne SDS.

Nach der Elektrophorese wurden die Platten mit 0,9 % NaCl gewaschen, im Heißluftstrom getrocknet und zehn Minuten ge- und 30 Minuten entfärbt (Färbe- und Entfärbelösung siehe Seite 39).

Tris-Barbiturat-Puffer pH 8,6

22,4 g Diäthylbarbitursäure

44,3 g Tris

0,533 g Calcium-Lactat

0,65 g Na-Azid

ad 1 l aqua bidest

2.12. Versuchsablauf

Die Hühner wurden am Tag t_0 mit *HSA* und *Brucella abortus* immunisiert. Am 7. Tag wurde ein Teil der Tiere entblutet und Serum gewonnen. Am 28. Tag wurden die übrigen Hühner zum zweiten Mal immunisiert, am 56. Tag entblutet und wieder Serum gewonnen. Das Serum wurde bei -40°C eingefroren und alle weiteren Untersuchungen jeweils in einem Arbeitsgang durchgeführt.

Mit Hilfe der *Rocket-Immunelektrophorese* wurden die Immunglobulinkonzentrationen der einzelnen Seren bestimmt und die Einteilung der Tiere zur Gruppe der normo- oder dysgammaglobulinämischen UM-B19 Tiere und der Kontrollhühner vorgenommen.

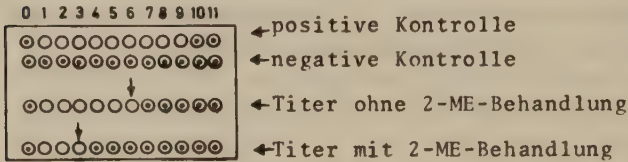
Anschließend wurde der *Häm-* und der *Brucellenagglutinationstiter* eines jeden Serums bestimmt und die Seren mit niedrigen Titern verworfen. Aus den restlichen Seren wurden *Serumpools* hergestellt. Es entstanden sechs Pools, und zwar je drei Pools mit frühen und späten Antikörpern (Kontroll-, normo- und dysgammaglobulinämische Tiere). Die Serumpools wurden in Portionen bei -40°C eingefroren. Mit ihnen wurden dann erst die eigentlichen Untersuchungen durchgeführt (immer in einem Arbeitsgang, um möglichst gleiche Bedingungen zu gewährleisten).

Es wurde wieder eine *Rocket-Immunelektrophorese*, eine *Häm-* und eine *Brucellenagglutination* gemacht. Anschließend erfolgte die *Behandlung der Seren mit Mercaptoäthanol* wie in der *Häm-* bzw. *Brucellenagglutination* und die Seren wurden mit der *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese* aufgetrennt. Danach wurden die Serumtiter ohne und mit Mercaptoäthanol-Behandlung mit Hilfe des *ELISA* bestimmt. Über die *Affinitätschromatographie* wurden aus den unbehan-

delten Seren die intakten HSA-Antikörper und aus den mit Mercaptoäthanol reduzierten Proben die Bruchstücke der HSA-Antikörper gewonnen. Nach Einengung der Eluate wurden diese auf das *SDS-Gel* aufgetragen. Durch Mitlaufenlassen von Markersubstanzen während der Elektrophorese konnte das *Molekulargewicht der Bruchstücke errechnet* werden. Um die Zugehörigkeit der Fragmente zu den einzelnen Immunglobulinen zu bestimmen, wurde dann noch eine *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in Kombination mit einer zweidimensionalen Immunelektrophorese* durchgeführt.

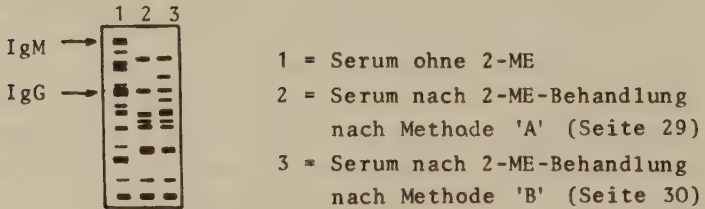
Untersuchung der Serumpools

1. Rocket-Immunelektrophorese zur Bestimmung der Immunglobulingehalte der Serumpools
2. Bestimmung der Antikörper-Titer durch Häm- und Brucellenagglutination

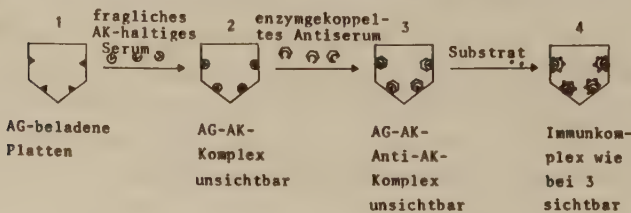


Lochreihe 0 enthält nur PBS und Erythrozyten oder Brucellen

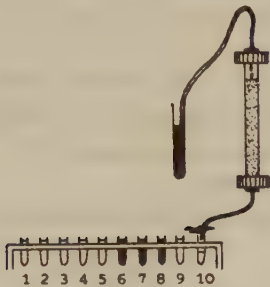
3. Auftrennung der unbehandelten und der mit 2-ME-behandelten Seren in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese



4. Bestimmung der isotypspezifischen ELISA-Titer ohne und mit 2-ME-Behandlung der Serumpools nach Methode 'A'/'B'

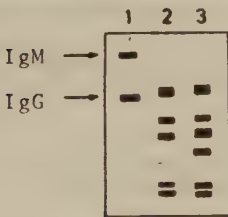


5. Affinitätschromatographie zur Isolierung der HSA-Antikörper bzw. ihrer Bruchstücke



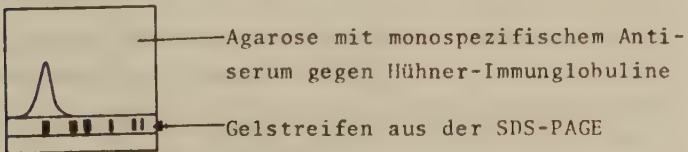
- a) Dialyse gegen Startpuffer
- b) Säulenlauf
- c) Extinktionsmessung der Eluatfraktionen bei 280 nm im UV-Licht, danach Zusammenfassen des Peaks zu einer Eluatprobe
- d) Konzentrierung des Eluats mit Polyäthylenglykol

6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der Eluate zur Molekulargewichtsbestimmung der Antikörper und ihrer Bruchstücke



- 1 = Serumprobe ohne 2-ME
- 2 = Serumprobe nach 2-ME-Behandlung nach 'A'
- 3 = Serumprobe nach 2-ME-Behandlung nach 'B'

7. PAGE-CIEP (= SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in Kombination mit Zweidimensionaler Immunelektrophorese) zur Überprüfung der Zugehörigkeit der Fragmente zu den einzelnen Immunglobulinen



3. Ergebnisse

3.1. Erstellung der Serumpools

Vor dem Erstellen der Serumpools wurde vom Serum eines jeden Tieres eine *Rocket-Immunelektrophorese* zur Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen, eine *Häm-* und eine *Brucellenagglutination* durchgeführt.

Die Ergebnisse sind aus den Tabellen auf den nachfolgenden Seiten ersichtlich.

Aus diesen Seren, von denen unterschiedliche Mengen verfügbar waren, wurden dann Pools gebildet, je ein Pool aus *frühen* und *späten* Antikörpern von *Kontroll-*, *normo-* und *dysgammaglobulinämischen Hühnern*, d.h. es entstanden sechs Serumpools, mit denen dann weitergearbeitet wurde. Bei den dysgammaglobulinämischen Tieren war die Sterblichkeit leider hoch, so daß mehrere Tiere während des Versuchs ausfielen.

Die Serumpools wurden folgendermaßen bezeichnet:

- Ko I* = Serumpool von Kontrolltieren, frühe Antikörper
(7. Tag nach der Immunisierung)
- No I* = Serumpool von normogammaglobulinämischen Tieren,
frühe Antikörper
- Dys I* = Serumpool von dysgammaglobulinämischen Tieren,
frühe Antikörper
- Ko II* = Serumpool von Kontrolltieren, späte Antikörper
(56. Tag nach der Immunisierung)
- No II* = Serumpool von normogammaglobulinämischen Tieren,
späte Antikörper
- Dys II* = Serumpool von dysgammaglobulinämischen Tieren,
späte Antikörper

Tab.1: Häm- und Brucellenagglutinationstiter ($-\log_2$) der frühen Antikörper (7. Tag nach Immunisierung) sowie die IgG- und IgM-Gehalte (mg/ml) im Serum der Einzeltiere

Agglutinationstiter gegen								
Tier	HSA			B.abortus			Ig-Gehalte	
	-ME	+ME		-ME	+ME		IgG	IgM
1. Kontrolltiere								
1	7	4		7	4		12,64	3,40
2	7	3		8	3		9,68	3,76
3	7	5		4	0		5,36	1,20
4	6	2		7	3		7,60	2,68
2. Normogammaglobulinämische Tiere								
1	7	4		9	3		7,92	3,28
2	8	4		8	2		8,16	2,32
3	9	6		6	0		6,64	1,32
3. Dysgammaglobulinämische Tiere								
1	8	0		7	1		<0,05	6,08
2	5	0		7	0		0,13	12,08

Die IgA-Gehalte wurden in den Seren mit frühen Antikörpern nicht bestimmt.

Die Zeichen > und < bedeuten: größer oder kleiner als die mit der Methode noch erfaßten Werte bei dem jeweiligen Versuchsansatz.

Die Abkürzungen "-ME" und "+ME" bedeuten: Agglutinationstiter ohne und mit 2-ME-Behandlung des Serums.

Tab.2: Häm- und Brucellenagglutinationstiter ($-\log_2$) der späten Antikörper (56. Tag nach Immunisierung) sowie IgG-, IgM- und IgA-Gehalte (mg/ml) im Serum der Einzeltiere

Agglutinationstiter gg.									
Tier	HSA		B.abortus		Ig-Gehalte				
	-ME	+ME	-ME	+ME	IgG	IgM	IgA		
1. Kontrolltiere									
1	>12	10		3 2		12,82	1,92	0,31	
2	5	4		6 6		12,64	1,12	0,20	
3	3	1		5 4		8,64	1,92	0,38	
4	5	2		4 1		6,72	2,40	0,28	
5	8	6		3 3		11,04	0,52	0,16	
6	6	6		4 3		12,26	1,12	0,23	
2. Normogammaglobulinämische Tiere									
1	6	4		4 3		10,64	2,52	0,16	
2	8	4		3 3		9,84	1,68	0,18	
3	10	8		5 4		7,12	2,00	0,33	
4	>12	>12		4 4		7,84	2,32	0,17	
5	3	0		7 6		11,44	2,68	0,51	
6	10	8		8 6		12,65	3,88	0,70	
7	6	5		3 2		9,04	2,20	0,43	
3. Dysgammaglobulinämische Tiere									
1	2	0		8 0		<0,05	8,40	0,68	
2	5	0		6 2		0,09	11,72	1,42	
3	4	0		6 2		<0,05	10,32	1,65	

Zeichen und Abkürzungen siehe vorherige Seite.

3.2. Immunglobulinkonzentrationen der Serumpools

Die Immunglobulinkonzentrationen (IgG, IgM und IgA) wurden bestimmt, um zu sehen, wie hoch die IgG-Konzentration in den dysgammaglobulinämischen Seren war bzw. wie sich die Immunglobulinkonzentrationen nach den Immunisierungen verhielten.

Tab.3: Serumimmunglobulingehalte (mg/ml) der Pools

1. Immunglobulingehalte 7 Tage nach Immunisierung

	Ig-Gehalte		
	IgG	IgM	IgA
Kontrolltiere	7,60	3,36	0,52
Normogammaglobulinämische Tiere	6,88	2,88	0,60
Dysgammaglobulinämische Tiere	0,06	10,40	1,30

2. Immunglobulingehalte 56 Tage nach Immunisierung

	Ig-Gehalte		
	IgG	IgM	IgA
Kontrolltiere	9,60	1,70	0,28
Normogammaglobulinämische Tiere	10,08	2,50	0,41
Dysgammaglobulinämische Tiere	<0,05	11,60	1,50

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß bei den *dysgammaglobulinämischen Tieren* auch nach den Immunisierungen deutlich erniedrigte IgG-Gehalte bei stark erhöhten IgM- und auch IgA-Konzentrationen vorliegen. Es ist fast kein IgG nachweisbar, IgM und IgA steigen nach der Boosterung leicht an.

Bei den *Kontroll-* und *normogammaglobulinämischen Tieren* steigt die IgG-Konzentration nach der Boosterung an, während die IgM- und IgA-Gehalte sinken.

3.3. Ergebnisse der Agglutination

Mit Hilfe der Agglutination wurden die Antikörpertiter der Serumpools gegen HSA bzw. *Brucella abortus* bestimmt. Sie erfaßt die Antikörperaktivität und unterscheidet zwischen 2-ME-resistenten und 2-ME-sensitiven Antikörpern.

Bei der *passiven Hämagglutination* sanken die Titer nach 2-ME-Behandlung bei den frühen Antikörpern um drei bzw. vier Stufen, bei den späten Antikörpern fiel der Wert bei Ko II um zwei Titerstufen und bei No II lag er vor und nach Reduktion überhalb des Meßbereiches.

Bei den dysgammaglobulinämischen Seren wurde der Titer durch die 2-ME-Behandlung der Proben auf die Stufe 0 reduziert (siehe Tabelle).

Tab.4: Hämagglutinationstiter ($-\log_2$) der Serumpools

Pool	Ko I	No I	Dys I		Ko II	No II	Dys II
ohne 2-ME	8	9	7		12	>12	6
mit 2-ME	5	5	0		10	>12	0

In der *Brucellenagglutination* fielen die Titer nach 2-ME-Reduktion um vier bis sieben Stufen bei den frühen Antikörpern, während sie bei den späten Antikörpern um drei bzw. sieben Stufen sanken (siehe Tabelle).

Tab.5: Brucellenagglutinationstiter ($-\log_2$) der Serumpools

Pool	Ko I	No I	Dys I		Ko II	No II	Dys II
ohne 2-ME	8	7	8		5	7	9
mit 2-ME	4	2	1		2	4	2

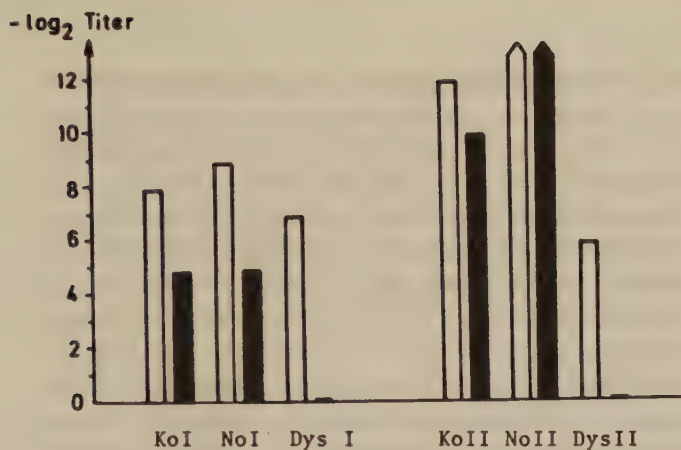


Abb.5: Hämagglutinationstiter der Serumpools

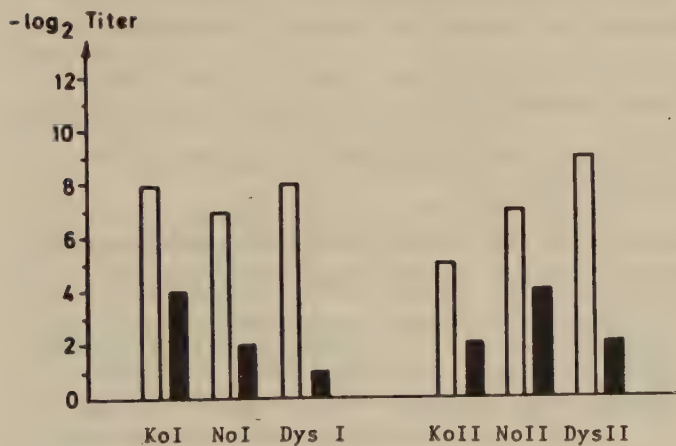


Abb.6: Brucellenagglutinationstiter der Serumpools

I = frühe Antikörper (7. Tag nach Immunisierung)
 II = späte Antikörper (56. Tag nach Immunisierung)
 Ko = Kontrollen; No = normo-, Dys = dysgammaglobulinämische Hühner

□ = Titer ohne 2-ME-Behandlung

■ = Titer mit 2-ME-Behandlung

Umkehrung der Inkubationsbedingungen bei der Agglutination

Um zu sehen, ob die unterschiedlichen Bedingungen während der Inkubation der Seren mit 2-ME den Titer verändern, wurde die Platte mit den Erythrozyten (nach 90 Minuten 2-ME-Inkubation des Serums bei 37°C) für 24 Stunden bei 37°C und dann für zwei Stunden bei 4°C gehalten ($\hat{=}$ der Brucellenagglutination; als "37°C" bezeichnet in Tabelle 6 bei der Hämagglutination) und die Platte mit den Brucellen wurde (nach 90 Minuten Inkubation des Serums bei 37°C mit 2-ME) für zwei Stunden bei Zimmertemperatur und 18 Stunden bei 4°C aufbewahrt ($\hat{=}$ der Hämagglutination; als "4°C" bezeichnet bei der Brucellenagglutination in Tab.6).

Die eingekreiste Zahl in Tabelle 6 steht für die übliche Aufbewahrung bei der jeweiligen Agglutinationsmethode.

"-ME" bedeutet: Titer des Serums ohne 2-ME-Behandlung.

Die Abkürzungen entsprechen den auf Seite 53 beschriebenen.

Es zeigte sich, daß praktisch keine Differenzen in den Antikörpertitern auftraten.

Tab.6: Vergleich der Titer ($-\log_2$) der Häm- und Brucellenagglutination bei verschiedener 2-ME-Behandlung

Pool	Hämagglutination					Brucellenagglutination			
	4°C		37°C			37°C		4°C	
	-ME	+ME	-ME	+ME		-ME	+ME	-ME	+ME
Ko I	8	5	8	5		8	4	9	4
No I	9	5	9	6		7	2	7	2
Dys I	7	0	7	0		8	1	7	1
Ko II	12	10	12	10		5	2	5	2
No II	>12	>12	>12	>12		7	4	7	4
Dys II	6	0	6	0		9	2	8	1

3.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine in den unbehandelten und mit 2-ME behandelten Serumpools

Um beurteilen zu können, inwieweit die Immunglobulinstruktur durch die Inkubation des Serums mit 2-ME beeinflusst wurde (totale oder partielle Aufspaltung) wurde eine SDS-PAGE durchgeführt.

Die unbehandelten Serumproben wurden direkt neben der jeweiligen mit 2-ME nach Methode 'A' (Seite 29) bzw. 'B' (Seite 30) behandelten Serumprobe auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt, um zu sehen, ob und welche Veränderungen bei der Reduktion auftraten. Reines IgG, IgM und IgA vom Huhn liefen als Marker mit.

Es zeigte sich (siehe Abb. 13, Seite 67):

1. In den unbehandelten Serumproben war kein IgA zu sehen.
2. Bei den dysgammaglobulinämischen Tieren war im Originalserum keine IgG-Bande sichtbar.
3. In allen mit 2-ME behandelten Proben fehlten u.a. die Banden des IgM und des IgG.
4. Einige neue Banden traten in den 2-ME-behandelten Seren auf, die sich z.T. bei Reduktion nach Methode 'A' und 'B' (Seite 29/30) unterschieden.

Es war unklar, ob alle neu aufgetretenen Banden nach der Reduktion von den Immunglobulinen stammten oder ob auch andere Serumbestandteile von der Reduktion betroffen waren. Deshalb wurde anschließend eine Affinitätschromatographie durchgeführt, in der die HSA-Antikörper und ihre Bruchstücke isoliert wurden.

Da bei der Reduktion nach Methode 'A' (Δ Hämagglutinationsverhältnisse) z.T. andere Banden auftraten als bei Methode 'B' (Δ Brucellenagglutinationsbedingungen), wurden alle weiteren Untersuchungen unter beiden Inkubationsbedingungen durchgeführt, um feststellen zu können, ob die verschiedenen Banden durch unterschiedliche Bruchstücke der reduzierten Immunglobuline entstanden waren.

3.5. Ergebnisse des ELISA

Um zu sehen, wie sich die Antikörperbindungsfähigkeit der einzelnen Immunglobulinklassen durch 2-Mercaptoäthanol-Reduktion verändert, wurde der ELISA durchgeführt.

Als Antigene wurden *HSA* und *Brucellen* verwendet, d.h. einmal wurde HSA und einmal Brucellenantigen an die Micro-ELISA-Platten gekoppelt.

Um festzustellen, ob sich durch Zugabe von phosphatgepufferter Saline (PBS) zum Originalserum der Titer ändert, wurde anstelle von 2-ME der Versuch auch mit PBS (Verdünnungsflüssigkeit für 2-ME) durchgeführt.

Außerdem wurde eine *Komplementinaktivierung* (Erhitzung des Serums im Wasserbad auf 56°C für 30 Minuten) vorgenommen. Da beide Manipulationen keinen Einfluß auf den Titer hatten, wird dieser Teil der Untersuchung in den Ergebnissen nicht weiter erwähnt.

Da im ELISA die Immunglobulinklassen spezifisch erfaßt wurden, wird der Titer für jedes einzelne Immunglobulin für das Originalserum aus dem Pool angegeben, sowie nach Behandlung mit 2-ME wie bei der Hämagglutination (als +ME 'A' bezeichnet) und wie in der Brucellenagglutination (als +ME 'B' bezeichnet).

Die HSA-Titer der Wascheluate aus der Affinitätschromatographie lagen meistens bei 0, nur selten trat ein Titer von 1 auf, d.h. alle HSA-Antikörper und ihre Fragmente waren von der Affinitätssäule gebunden worden und lagen jetzt im Eluat vor.

Die ELISA-Titer des IgA liegen im Vergleich zu denen des IgG oder IgM relativ hoch. Die Ursache dafür ist die längere Einwirkungszeit des Enzyms bei IgA (siehe Seite 33).

1. Titerveränderungen bei den IgG-Antikörpern nach 2-ME-Behandlung des Serums

a) HSA als Antigen

Bei den frühen Ak sank die Bindungsfähigkeit nach 2-ME-Behandlung nach 'A' auf die Hälfte, bei den späten Ak auf ein Viertel des Ausgangswertes (Titer fiel um 1 - 2 Stufen). Die Reduktion nach 'B' verursachte bei den frühen und späten Ak einen Aktivitätsverlust auf 1/8 bis 1/16 (Titer fiel um 3 - 4 Stufen).

Tab.7: IgG-Antikörpertiter (ELISA, $-\log_2$) gegen HSA

Pool	Ko I	No I	Dys I	Ko II	No II	Dys II
-ME	10	10	0	10	11	0
+ME 'A'	9	9	0	8	9	0
+ME 'B'	7	6	0	6	7	0

b) *Brucella abortus* als Antigen

Bei Aufbewahrung des Serums mit 2-ME nach 'A' fiel die Ak-Bindungsaktivität auf 25 - 50 % (Titer um 1 - 2 Stufen) bei frühen und späten Ak.

Bei Behandlung nach 'B' reduzierte sie sich bei den frühen Ak auf 12,5 bzw. 6,25 %, bei den späten auf 6,25 % (Titer sank um 3 bzw. 4 Stufen).

Tab.8: IgG-Antikörpertiter (ELISA, $-\log_2$) gegen B.abortus

Pool	Ko I	No I	Dys I	Ko II	No II	Dys II
-ME	6	5	0	7	7	0
+ME 'A'	4	3	0	5	6	0
+ME 'B'	2	2	0	3	3	0

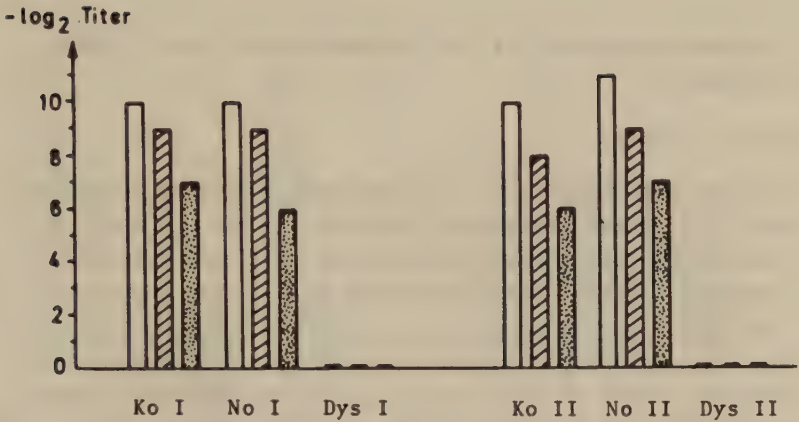


Abb. 7: IgG-Antikörpertiter (ELISA, $-\log_2$) gegen HSA mit und ohne 2-ME-Inkubation der sechs Serumpools

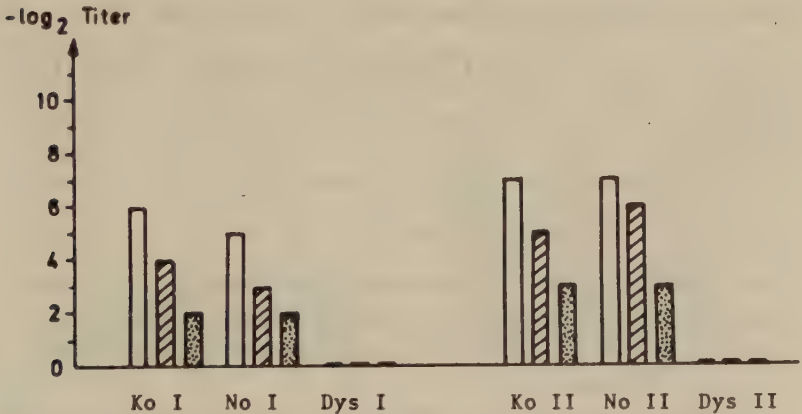


Abb. 8: IgG-Antikörpertiter (ELISA, $-\log_2$) gegen B.abortus mit und ohne 2-ME-Inkubation der sechs Serumpools

I = frühe Antikörper (7. Tag nach Immunisierung)

II = späte Antikörper (56. Tag nach Immunisierung)

Ko = Kontrollen; No = normo-, Dys = dysgammaglobulinämische Hühner

□ = Titer ohne 2-ME-Behandlung des Serumpools

▨ = Titer nach 2-ME-Behandlung des Serumpools nach 'A'

▩ = Titer nach 2-ME-Behandlung des Serumpools nach 'B'

2. Titerveränderungen bei den IgM-Antikörpern nach 2-ME-Behandlung

a) HSA als Antigen

Bei den frühen Ak sank der Titer nach Reduktion nach 'A' um 3 - 8 Stufen (Aktivität fiel auf 1/8 bis 1/256), während er bei den späten gleich blieb oder sich nur um eine Stufe reduzierte (Aktivität blieb gleich oder sank auf die Hälfte).

Nach Inkubation des Serums mit 2-ME nach 'B' lag der Titer bei den frühen Ak bei 0 bzw. 1, bei den späten bei etwa der Hälfte des Ausgangswertes, d.h. die Aktivität sank bei den späten Ak auf 1/4 bis 1/8.

Tab.9: IgM-Antikörpertiter (ELISA, $-\log_2$) gegen HSA

Pool	Ko I	No I	Dys I	Ko II	No II	Dys II
-ME	7	6	10	3	6	5
+ME 'A'	2	3	2	3	6	4
+ME 'B'	0	0	1	1	3	2

b) Brucella abortus als Antigen

Die Reduktion nach 'A' führte bei den frühen Ak zu einem Aktivitätsverlust von 87,5 - 98,5 % (Titerabfall 3 - 6 Stufen) und von 50 - 75 % bei den späten Ak (Titer sank um 1 - 2 Stufen).

Die Behandlung der Seren nach 'B' ergab nur noch Titer zwischen 0 und 2 bei frühen und späten Ak.

Tab.10: IgM-Antikörpertiter (ELISA, $-\log_2$) gegen B.abortus

Pool	Ko I	No I	Dys I	Ko II	No II	Dys II
-ME	8	6	6	8	7	9
+ME 'A'	2	1	3	7	6	7
+ME 'B'	0	0	2	1	1	2

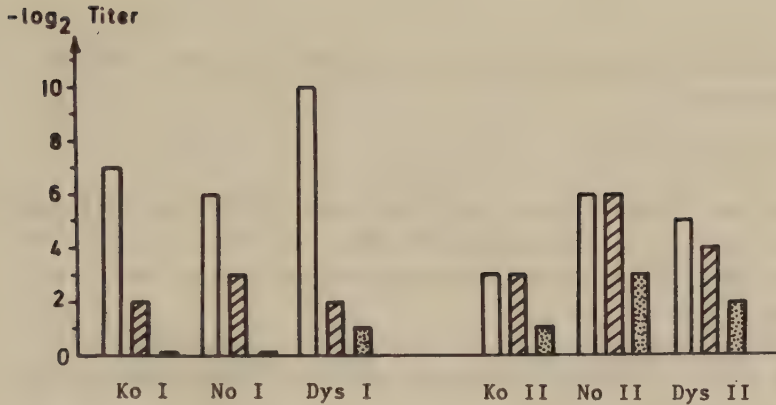


Abb. 9: IgM-Antikörpertiter (ELISA, -log₂) gegen HSA mit und ohne 2-ME-Inkubation der sechs Serumpools

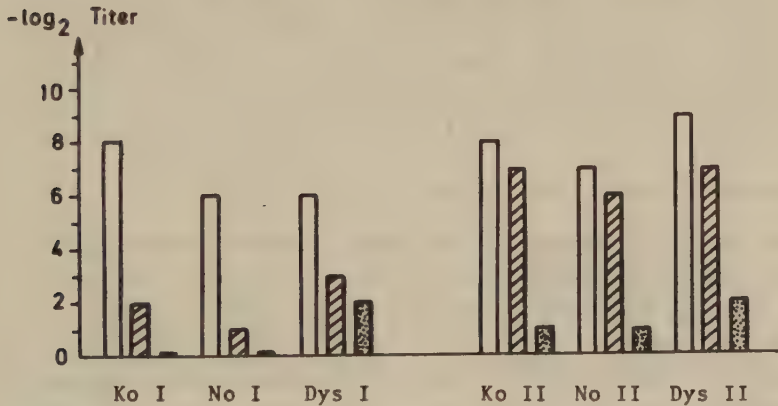


Abb. 10: IgM-Antikörpertiter (ELISA, -log₂) gegen B.abortus mit und ohne 2-ME-Inkubation der sechs Serumpools

I = frühe Antikörper (7. Tag nach Immunisierung)

II = späte Antikörper (56. Tag nach Immunisierung)

Ko = Kontrollen; No = normo-, Dys = dysgammaglobulinämische Hühner

□ = Titer ohne 2-ME-Behandlung des Serumpools

▨ = Titer nach 2-ME-Behandlung des Serumpools nach 'A' (S.29)

▩ = Titer nach 2-ME-Behandlung des Serumpools nach 'B' (S.30)

3. Titerveränderungen bei den IgA-Antikörpern nach 2-ME-Behandlung

a) HSA als Antigen

Bei den frühen Ak sank der Titer nach 2-ME-Behandlung nach 'A' um 1 - 2 Stufen (Aktivität fiel auf 1/2 bis 1/4), während er bei den späten Ak entweder gleich blieb oder nur um eine Stufe fiel.

Bei der Reduktion nach 'B' sank der Titer bei den frühen Ak um 2 - 3 Stufen (Aktivität fiel auf 1/4 - 1/8), bei den späten Ak um 1 - 2 Stufen.

Tab.11: IgA-Antikörpertiter (ELISA, $-\log_2$) gegen HSA

Pool	Ko I	No I	Dys I	Ko II	No II	Dys II
-ME	4	3	3	4	2	4
+ME 'A'	2	2	2	4	2	3
+ME 'B'	1	1	1	2	1	2

b) Brucella abortus als Antigen

Die Ak-Bindungsaktivität sank nach 2-ME-Behandlung nach 'A' bei den frühen Ak auf 1/4 bis 1/8 (Titer fiel um 2 - 3 Stufen), bei Behandlung nach 'B' auf 1/8 bis 1/16.

Bei den späten Ak blieb der Titer nach 2-ME-Inkubation nach 'A' gleich oder er fiel nur um eine Stufe, nach Reduktion nach 'B' fiel er um 1 - 3 Stufen (Aktivität sank auf 1/2 bis 1/8).

Tab.12: IgA-Antikörpertiter (ELISA, $-\log_2$) gegen B.abortus

Pool	Ko I	No I	Dys I	Ko II	No II	Dys II
-ME	5	6	4	6	8	6
+ME 'A'	3	3	2	6	7	5
+ME 'B'	2	2	1	5	6	3

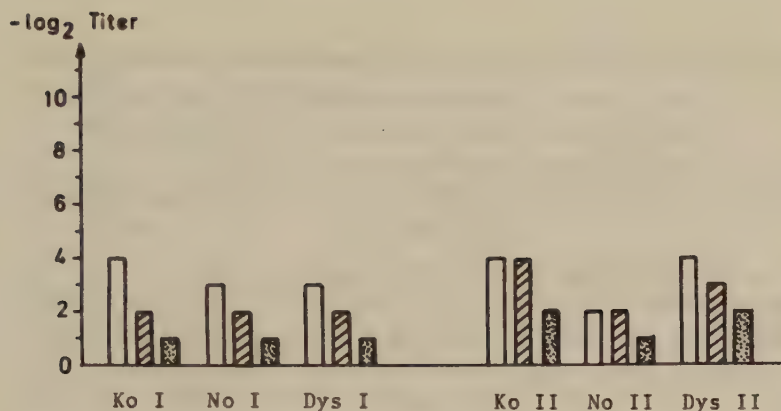


Abb.11: IgA-Antikörpertiter (ELISA, $-\log_2$) gegen HSA mit und ohne 2-ME-Inkubation der sechs Serumpools

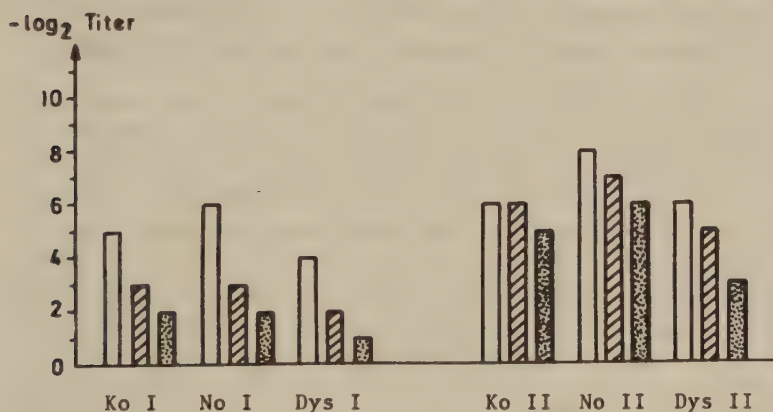


Abb.12: IgA-Antikörpertiter (ELISA, $-\log_2$) gegen B.abortus mit und ohne 2-ME-Inkubation der sechs Serumpools

I = frühe Antikörper (7. Tag nach Immunisierung)

II = späte Antikörper (56. Tag nach Immunisierung)

Ko = Kontrollen; No = normo-, Dys = dysgammaglobulinämische Hühner

□ = Titer ohne 2-ME-Behandlung des Serumpools

▨ = Titer nach 2-ME-Behandlung des Serumpools nach 'A' (S.29)

▩ = Titer nach 2-ME-Behandlung des Serumpools nach 'B' (S.30)

Tab.13: Übersicht: Isotypspezifische Antikörpertiter (ELISA, $-\log_2$) gegen HSA und B.abortus ohne und mit 2-ME-Behandlung der sechs Serumpools nach Methode 'A' bzw. 'B' (siehe Seite 29/30).

HSA				B.abortus			
IgG	IgM	IgA		IgG	IgM	IgA	
a) Frühe Antikörper (7. Tag nach Immunisierung)							
Kontrollen	10	7	4		6	8	5
+ME 'A'	9	2	2		4	2	3
+ME 'B'	7	0	1		2	0	2
Normogammaglob.Tiere	10	6	3		5	6	6
+ME 'A'	9	3	2		3	1	3
+ME 'B'	6	0	1		2	0	2
Dysgammaglob. Tiere	0	10	3		0	6	4
+ME 'A'	0	2	2		0	3	2
+ME 'B'	0	1	1		0	2	1
b) Späte Antikörper (56. Tag nach Immunisierung)							
Kontrollen	10	3	4		7	8	6
+ME 'A'	8	3	4		5	7	6
+ME 'B'	6	1	2		3	1	5
Normogammaglob.Tiere	11	6	2		7	7	8
+ME 'A'	9	6	2		6	6	7
+ME 'B'	7	3	1		3	1	6
Dysgammaglob. Tiere	0	5	4		0	9	6
+ME 'A'	0	4	3		0	7	5
+ME 'B'	0	2	2		0	2	3

3.6. Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptide mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Um die Identifizierung der Antikörperbruchstücke zu erleichtern, wurde ihr MG mit der SDS-PAGE bestimmt.

Zuerst wurden die *Euate der HSA-Affinitätschromatographie* (gereinigte HSA-Antikörper), die aus den *unbehandelten Serumproben* stammten, in der *SDS-PAGE* aufgetrennt (Eichproteine und reines IgG, IgM und IgA vom Huhn liefen als Marker mit). Dies führte zu folgendem Ergebnis:

1. In keinem Serumpool waren genügend IgA-Antikörper gegen HSA vorhanden, um auf dem Gel eine sichtbare Bande zu hinterlassen (sie wäre jetzt eindeutig erkennbar gewesen, da nur noch ein bis zwei Banden vorkamen).
2. In den Pools mit den frühen und späten Antikörpern waren bei den Seren der Kontroll- und normogammaglobulinämischen Hühner jeweils eine Bande für IgM mit einem MG von etwa 900.000 und eine für IgG mit einem MG von etwa 170.000 zu finden.
3. Bei den Pools der dysgammaglobulinämischen Hühner war bei den frühen und späten Seren nur die IgM-Bande bei einem MG von etwa 900.000 sichtbar.

Die Auftrennung der *Euate* der mit 2-ME inkubierten Seren ergab bei Methode 'A' und 'B' fünf bis sieben Banden (siehe Abb. 14 auf Seite 67).

Bei allen reduzierten Serumpools traten Bruchstücke der Immunglobuline mit einem MG von etwa 180.000, 70.000, 30.000 und 25.000 auf. Nicht in allen Proben waren Fragmente mit einem MG von 360.000, 95.000 und 55.000 zu finden (siehe Tab.14 Seite 66).

Tab.14: Molekulargewichte der Antikörper und ihrer Bruchstücke mit und ohne Inkubation der Serumpools mit 2-Mercaptoäthanol, bestimmt in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

-ME	Frühe Antikörper		Späte Antikörper	
	+ME 'A'	+ME 'B'	+ME 'A'	+ME 'B'
1. Kontrolltiere				
900.000	(360.000)	(360.000)		(360.000)
170.000	180.000	180.000	180.000	180.000
	95.000	95.000	95.000	95.000
	70.000	70.000	70.000	70.000
		(55.000)		55.000
	30.000	(30.000)	30.000	30.000
	25.000	25.000	25.000	25.000
2. Normogammaglobulinämische Tiere				
900.000		(360.000)		
170.000	180.000	180.000	180.000	180.000
	95.000	95.000	95.000	95.000
	70.000	70.000	70.000	70.000
		55.000		55.000
	30.000	30.000	30.000	30.000
	25.000	25.000	25.000	25.000
3. Dysgammaglobulinämische Tiere				
900.000		360.000	360.000	(360.000)
	180.000	180.000	180.000	180.000
	70.000	70.000	70.000	70.000
	(55.000)	55.000	55.000	55.000
	30.000	30.000	30.000	30.000
	25.000	25.000	25.000	25.000

Zahlen in Klammern bedeuten, daß die Bande im Gel nur schwach sichtbar war.

'A' bzw. 'B' entsprechen der 2-ME-Behandlung von S. 19/30.

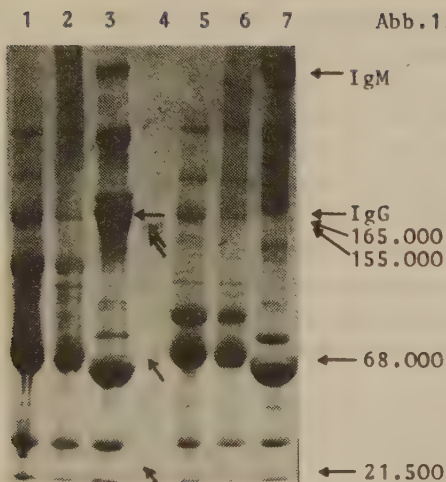


Abb.13: SDS-PAGE der unbehandelten und der nach 'A' bzw. 'B' (s.S.29/30) mit 2-ME behandelten normo- (No) und dysgammaglobulinämischen (Dys) Serumproben (56. Tag nach Immunisierung)

- 1 = No + 2-ME 'A'
- 2 = No + 2-ME 'B'
- 3 = No unbehandelt
- 4 = Marker (165.000, 155.000, 68.000, 21.500)
- 5 = Dys + 2-ME 'A'
- 6 = Dys + 2-ME 'B'
- 7 = Dys unbehandelt

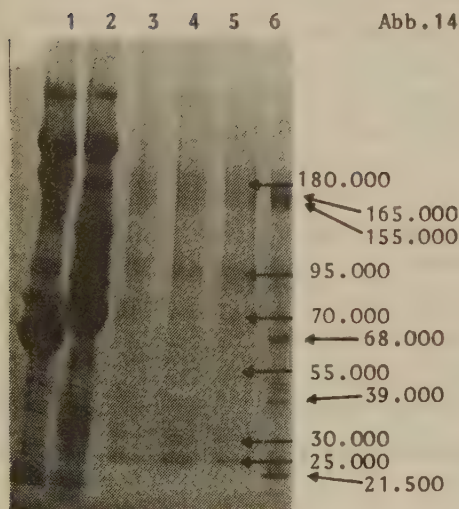


Abb.14: SDS-PAGE der unbehandelten und der nach 'B' (s. S. 30) mit 2-ME behandelten normogammaglobulinämischen (No) Serumprobe sowie der darin enthaltenen HSA-Antikörper und ihrer Bruchstücke (isoliert durch Affinitätschromatographie)

- 1 = No unbehandelt
- 2 = No + 2-ME 'B'
- 3-5 = Eluat nach Affinitätschromatographie des No + 2-ME 'B'
- 6 = Marker (165.000, 155.000, 68.000, 39.000, 21.500)

3.7. Zuordnung der durch 2-Mercaptoäthanol-Behandlung entstandenen Antikörperbruchstücke zu den einzelnen Immunglobulinen mit der PAGE-CIEP

Nachdem das Molekulargewicht der Antikörperbruchstücke bekannt war, mußte noch untersucht werden, von welchem Immunglobulin sie stammten. Dazu wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in Kombination mit der Zweidimensionalen Immunelektrophorese zu Hilfe genommen. Bei dieser Technik kommt es zur Präzipitation zwischen den Antigenen (gesuchte Antikörper und ihre Bruchstücke) und den gegen sie gerichteten Antikörpern in der Agarose.

- a) Bei den *nicht reduzierten Seren* traten in allen Pools Präzipitate mit monospezifischen Antiseren gegen Hühner-Immunglobuline bei der PAGE-CIEP auf. Die isolierten HSA-Antikörper (in dem Eluaten aus der Affinitätschromatographie) reagierten bei allen Serumpools mit *IgM*- und auch mit *IgA*-Antiserum, obwohl bei *IgA* keine Bande im SDS-Gel sichtbar war. Die PAGE-CIEP war also empfindlicher als die SDS-PAGE. Ein *IgG*-Peak trat nur bei den Eluaten der Kontroll- und normogammaglobulinämischen Serumpools auf. Die *IgG*-Antikörper in den Seren der dysgammaglobulinämischen Tiere waren auch mit dieser Methode nicht erfassbar.
- b) Bei den *2-ME-behandelten Seren* (2-ME-Reduktion wie in der Häm- bzw. Brucellenagglutination nach 'A' bzw. 'B' und HSA-Affinitätschromatographie zur Isolierung der HSA-Antikörper) konnten folgende Banden des SDS-Gels eindeutig einem bestimmten Immunglobulin zugeordnet werden:

1. PAGE-CIEP mit Antiserum gegen das *IgG* des Huhnes

Bei den dysgammaglobulinämischen Serumpools war kein Peak zu finden.

Bei den Seren der Kontroll- und normogammaglobulinämischen Hühner trat an der Stelle der Bande mit dem MG 95.000 ein deutlicher Peak auf, aber alle anderen Banden des SDS-Gels zeichneten nicht mit dem Antiserum gegen IgG.

2. *PAGE-CIEP mit Antiserum gegen das IgM des Huhnes*

Bei dieser Untersuchung wurde in allen Proben ein Peak beim MG 180.000 gefunden, aber keine weiteren.

3. *PAGE-CIEP mit Antiserum gegen das IgA des Huhnes*

Hier konnte keine Reaktion der Immunglobuline oder ihrer Bruchstücke mit dem Antiserum entdeckt werden.

4. Da die meisten Bruchstücke noch nicht identifiziert waren, wurde dann noch eine *PAGE-CIEP mit polyspezifischem Antiserum gegen Hühnerimmunglobuline* durchgeführt.

Mit Hilfe des polyspezifischen Antiserums konnte eindeutig gezeigt werden, daß in den Banden mit dem MG 70.000 und 25.000 Antikörperbruchstücke von allen drei Immunglobulinen (bei den Seren der dysgammaglobulinämischen Tiere von zwei Immunglobulinen) enthalten waren, da jeweils drei (zwei) verschieden hohe Peaks zu sehen waren (siehe Abb.15, Seite 70).

Die Banden mit dem MG 360.000, 55.000 und 30.000 konnten mit dieser Methode nicht identifiziert werden.

Nach den Molekulargewichtsangaben in der Literatur (siehe Seite 9) und eigenen Untersuchungen zum Molekulargewicht lassen die Ergebnisse folgende Schlüsse zu:

Bei der Reduktion des Serums mit 0,1 m 2-ME zerfallen die Immunglobuline des Huhnes in folgende Bruchstücke, wie nach der Isolierung der HSA-Antikörper und ihrer Fragmente in der Affinitätschromatographie, nach MG-Bestimmung in der SDS-PAGE und Zuordnung der Bruchstücke zu den einzelnen Immunglobulinen in der PAGE-CIEP nachgewiesen werden konnte:

1. IgG dissoziiert in HL-Untereinheiten (MG 95.000) und freie H- und L-Ketten (MG 70.000 und 25.000).
2. IgM wird völlig gespalten in monomere Untereinheiten (H_2L_2 mit dem MG 180.000) und freie H- und L-Ketten (MG 70.000 und 25.000).
3. IgA-Veränderungen konnten mit den angewandten Methoden nicht erfaßt werden.

Zu diskutieren bleiben noch die Bruchstücke mit dem MG 360.000, 55.000 und 30.000, deren Zugehörigkeit zu einem bestimmten Immunglobulin nicht nachgewiesen werden konnte.

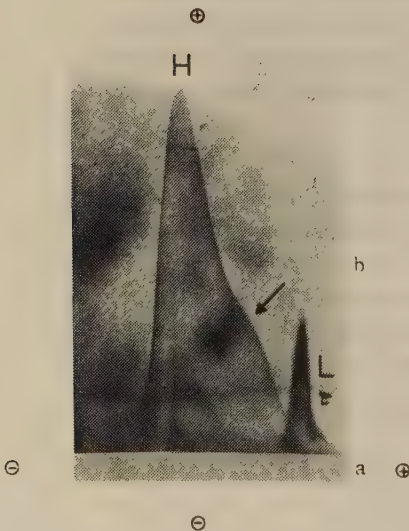


Abb.15: Immunologische Identifizierung der H- und L-Ketten der Immunglobuline durch PAGE-CIEP nach Reduktion des Serums von Kontrollhühnern (56.Tag nach Immunisierung) nach Methode 'A' (s.S.29).

- a = Gelstreifen aus der SDS-PAGE (Elektrophoreselauf von $\ominus$ nach $\oplus$ = von links nach rechts)
- b = Agarosegel, das 10 % polyspezifisches Antiserum enthält.
- ($\rightarrow$ Schulter = Artefakt, bedingt durch Agaroseklumpen im Agarosegel)

4. Diskussion

Die von Kontroll-, normo- und dysgammaglobulinämischen Hühnern gegen Humanserumalbumin und *Brucella abortus* gebildeten Antikörper wurden nach Behandlung des Serums mit 2-Mercaptoäthanol untersucht.

Dabei wurden die Inkubationsbedingungen der Häm- und der Brucellenagglutination simuliert:

Nach Inkubation des Serums für 90 Minuten mit 0,1 m 2-ME bei 37°C wurden die Proben

- a) zwei Stunden bei Zimmertemperatur und 18 Stunden bei 4°C aufbewahrt $\hat{=}$ Hämagglutinationsbedingungen (= Methode 'A'; Seite 29),
- b) 24 Stunden bei 37°C und anschließend zwei Stunden bei 4°C gehalten $\hat{=}$ Brucellenagglutinationsverhältnisse (Methode 'B'; Seite 30).

Nach Isolierung der HSA-Antikörper und ihrer Fragmente mittels Affinitätschromatographie konnten mit Hilfe der SDS-PAGE die Molekulargewichte der Antikörperbruchstücke nach der Reduktion bestimmt werden. Die Zugehörigkeit dieser Fragmente zu den einzelnen Immunglobulinen wurde in der PAGE-CIEP überprüft (nach Auftrennung der Proben im SDS-Gel erfolgte eine Immunelektrophorese in zum ersten Lauf senkrechter Richtung).

Da die IgA-Antikörper für diese eben angesprochenen Methoden nicht in ausreichender Menge in den Seren vorlagen, konnten keine Untersuchungen zu eventuellen Strukturänderungen des IgA nach 2-ME-Inkubation des Serums durchgeführt werden.

Die Agglutinationsaktivitäten des Gesamtserums wurden in der Häm- und Brucellenagglutination, die Antikörperbin-

dungsfähigkeiten der IgG-, IgM- und IgA-Antikörper vor und nach der Inkubation des Serums mit 2-ME im *ELISA* überprüft.

1. Aktivitätsänderungen

1.1. Agglutination

In der Häm- und Brucellenagglutination sanken die Titer nach 2-ME-Inkubation der Immunseren bei den Kontroll- und normogammaglobulinämischen Tieren um durchschnittlich vier Stufen bei den frühen Antikörpern (7 Tage nach Immunisierung) und um 2 (Hämagglutination) bzw. 3 Stufen (Brucellenagglutination) bei den späten Antikörpern (56. Tag nach Immunisierung).

Bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern lag die Agglutinationsaktivität der Seren nach 2-ME-Behandlung in der Hämagglutination bei Null, in der Brucellenagglutination blieb noch eine geringe Restaktivität erhalten.

Das gleiche Titerverhalten bei den Seren der dysgammaglobulinämischen Tiere nach 2-ME-Behandlung ist bei LÖSCH et al. (1982) beschrieben.

Bei der Umkehrung der Inkubationsverhältnisse traten praktisch keine Veränderungen im Titer auf (die Platte mit den Erythrozyten wurde so mit 2-ME behandelt wie die mit den Brucellen und umgekehrt; siehe Seite 54).

Dieser Versuch zeigt, daß bei der Agglutination Zeitdauer und Temperatur der 2-ME-Inkubation des Serums unwichtig sind.

In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben zur Aktivität der Immunglobuline des *Huhnes* nach 2-ME-Reduktion:

Über die vollständige Zerstörung der Agglutinations-, Präzipitations- und Neutralisierungsaktivitäten des *IgM* des *Huhnes* nach 2-ME-Behandlung gibt es keine Zweifel (BENEDICT et al., 1962; FRANKLIN, 1962; UHR et al., 1962; BENEDICT et al., 1963; ROSENQUIST und CAMPBELL, 1966; LESLIE und BENEDICT, 1968; BRÜGGEMANN et al., 1971).

Beim *IgG* des *Huhnes* wurde eine teilweise bis völlige Inaktivierung der Agglutinations- und Präzipitationseigenschaften nach Reduktion beschrieben (BENEDICT et al., 1962, 1963; ROSENQUIST und GILDEN, 1963; SZENBERG et al., 1965; SCHRAM et al., 1971; GILLETTE, 1974 und andere), es ist aber auch zu finden, daß die Neutralisations- und Agglutinationsaktivität nur wenig vermindert wird (UHR et al., 1962; BRÜGGEMANN et al., 1971) bzw. daß die Agglutinationsaktivität voll erhalten bleibt (DELHANTY und SOLOMON, 1966).

Das *IgA* des *Huhnes* ist in der Agglutination partiell 2-ME-resistent (DELHANTY und SOLOMON, 1966; LÖSCH et al., 1982).

Die Autoren der Literatur arbeiteten fast immer mit gereinigten Antikörpern nicht mit Gesamtserum, d.h. sie behandelten die reinen Antikörper mit Reduktionsmitteln und führten dann die Agglutination, Präzipitation oder Neutralisierung durch.

Mit diesen Methoden ist es nicht möglich, die Aktivitätsänderungen der einzelnen Immunglobulinklassen nach der Reduktion des Gesamtserums zu messen.

Da dies durch die Anwendung des ELISA möglich geworden ist, sollten die Immunglobuline in der vorliegenden Arbeit vor der 2-ME-Behandlung nicht isoliert werden. Es sollte das Gesamtserum reduziert werden, um zu sehen, wie sich die Immunglobuline dann gegenüber 2-ME verhalten.

Im Gesamtserum sind neben den Immunglobulinen noch viele Serumproteine enthalten, die einen Schutz für die Immunglobuline bei der Reduktion darstellen müßten, da sie auch Disulfidbrücken haben und sich die Wirkung des 2-ME dann nicht nur auf die Immunglobuline beschränkt.

1.2. Antikörperbindung

Immunglobulin IgG

Die Inkubation der Immunsereen mit 2-ME nach Methode 'B' (Seite 30) bewirkte bei den Antikörpern gegen HSA und *Brucella abortus* einen Aktivitätsabfall um durchschnittlich vier Titerstufen, bei Behandlung nach Methode 'A' (Seite 29) einen solchen um 1 - 2 Titerstufen.

Zwischen frühen und späten Antikörpern bestand fast kein Unterschied (siehe Tab.13 Seite 64).

Hieraus geht zweierlei hervor:

1. Nach Inkubation antikörperhaltiger Seren mit 2-ME wird bei Methode 'B' ein größerer Anteil (ca. 95 %) der IgG-Antikörper inaktiviert als bei Methode 'A' (ca. 50 - 75 %).
2. Frühe und späte IgG-Antikörper gegen HSA und *Brucella abortus* unterscheiden sich fast nicht in ihrer Empfindlichkeit gegenüber 2-ME.

Zu 1.:

Beim *Huhn* wurden bisher nur durch ROSENQUIST und GILDEN (1963) die Aktivitätsänderungen des IgG nach 2-ME-Behandlung mit einem primären Antigen-Antikörper-Bindungstest gemessen. Bei ihnen trat nach Inkubation von reinem IgG mit 0,1 m 2-ME bei 4°C für 90 Minuten bis vier Stunden

ein Abfall der Antigenbindungsaktivität - gemessen im Farr-Test - um 60 - 80 % auf.

Obwohl dieser Versuch mit einer anderen Methode durchgeführt wurde (hier ELISA, dort Farr-Test) wurde ein ähnliches Ergebnis nach 2-ME-Reduktion erzielt.

In diesem Zusammenhang muß die Problematik der verschiedenen Wechselwirkungen von Antigen und Antikörper in vitro angesprochen werden.

Ob ein Antikörper im Agglutinations-, Präzipitations-, Neutralisations-Test, in der Komplementbindungsreaktion oder im Antigen- oder Antikörperbindungstest nachgewiesen wird, führt jeweils zu unterschiedlichen Aussagen (hier sind nur die Tests berücksichtigt, die bei der partiellen Reduktion der Immunglobuline in der angegebenen Literatur angewandt wurden).

Es gibt *primäre Bindungstests* zum Nachweis von Antikörpern, die die *direkte Interaktion zwischen Antigen und Antikörper* messen. Dazu gehören die Farr-Technik, die Immunfluoreszenz-Technik oder der ELISA. Sie sind am empfindlichsten.

Die *sekundären Bindungstests* dagegen messen die *Folgen einer Immunkomplexbildung in vitro*; diese Tests sind wesentlich unempfindlicher als die primären Bindungstests. Ob eine sekundäre Reaktion während des in vitro-Tests eintritt, hängt von mehreren Faktoren ab, wie z.B. der Qualität und Quantität der Antikörper und der Gegenwart von Kofaktoren wie Komplement (MINDEN et al., 1966).

Die Folgen einer Antigen-Antikörper-Reaktion umfassen die Präzipitation von löslichem Antigen, die Aktivierung der Komplementkaskade, die Agglutination partikulärer Antigene sowie die Virusneutralisation.

DREESMAN (1966) verglich die Ergebnisse mehrerer Autoren aus der Präzipitation, der Agglutination und der Farr-Technik und kam zu dem Schluß, daß es fast keine Korrelation zwischen den verschiedenen Tests gibt. Die Hämagglutinationsaktivitäten waren primär in der 19S-Fraktion (IgM) zu finden, die Präzipitations- und Antigenbindungsaktivitäten dagegen hauptsächlich in den 7S-Fraktionen (IgG) enthalten.

CHAN und DEUTSCH (1960) untersuchten die *IgM*-Antikörper des Menschen vor und nach Inkubation mit Reduktionsmitteln in der Hämagglutination und im Coombs-Test. Sie fanden, daß die Antikörper nach Reduktion in der Hämagglutination nicht mehr aktiv waren, aber im Coombs-Test noch das Antigen banden.

AARDEN et al. (1977) bewiesen ebenfalls, daß man die Methode des Antikörperrnachweises bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigen muß. Sie verglichen die Immunfluoreszenz-Technik mit dem Farr-Test und fanden ein unterschiedliches Verhalten der Titer nach Reduktion des menschlichen *IgG* bei beiden Methoden. Erstaunlicherweise stieg der Titer im Farr-Test um das Sechsfache nach der Reduktion während er in der Immunfluoreszenz-Technik gleich blieb.

Demnach ist es nicht möglich, die Ergebnisse aus sekundären Bindungstests mit denen aus primären zu vergleichen, aber auch ein Vergleich der Ergebnisse aus verschiedenen Bindungstests einer Gruppe ist nur bedingt möglich.(s.o.).

In der vorliegenden Arbeit konnten trotz der unterschiedlichen Methode im Vergleich zu ROSENQUIST und GILDEN (1963) - der Farr-Test ist ein Antigenbindungstest, der ELISA ein Antikörperbindungstest - ähnliche Ergebnisse nach Inkubation der Seren mit 2-ME bei 4°C erzielt werden.

Im Gegensatz zur *Agglutination* (s.o.) ist beim *ELISA* ein deutlicher, von den Inkubationsbedingungen abhängiger Unterschied im Aktivitätsverlust nach 2-ME-Behandlung erkennbar:

Nach Inkubation der Seren mit 2-ME nach Methode 'B' (Brucellenagglutinationsverhältnisse; Seite 30) müssen etwa 90 - 95 %, bei Methode 'A' (Hämagglutinationsbedingungen; Seite 29) etwa 50 - 75 % der IgG-Moleküle so verändert vorliegen, daß sie sich nicht mehr an das Antigen binden können.

Der Aktivitätsverlust durch 2-ME ist in der vorliegenden Arbeit zum Teil auf die Dissoziation einiger IgG-Moleküle in freie H- und L-Ketten zurückzuführen.

Im Gegensatz zum IgG des *Menschen*, das nach der Reduktion in neutralen Puffern noch durch nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten wird (EDELMAN und POULIK, 1961; SOLHEIM und HARBOE, 1972), dissoziiert das IgG des *Huhnes* unter diesen Bedingungen zu 35 (LESLIE und BENEDICT, 1969) bzw. 50 % (DREESMAN und BENEDICT, 1965a) in freie H- und L-Ketten.

Nach der 2-ME-Behandlung nach Methode 'B' war der Aktivitätsverlust in den hier durchgeführten Untersuchungen größer als bei Methode 'A' (Seite 29/30). Im SDS-Gel trat nur nach Inkubation der Seren von Kontroll- und normogammaglobulinämischen Tieren mit 2-ME nach Methode 'B' das Bruchstück mit dem MG 55.000 auf (siehe unter 3.6.). Das bedeutet, daß unter diesen Inkubationsbedingungen eine weitergehende Spaltung der Immunglobuline stattfindet als bei Methode 'A' und größere Veränderungen am Immunglobulinmolekül auftreten. Diese wirken sich dann wahrscheinlich nachteilig auf die Antikörperbindungsfähigkeit aus.

Nach 2-ME-Reduktion konnte ein Teil der IgG-Antikörper noch Antigen binden. Deshalb bleibt nach der Inkubation des Serums mit 2-ME eventuell ein Teil der IgG-Moleküle trotz Spaltung der Disulfidbrücken zwischen den H-Ketten (nachgewiesen in der SDS-PAGE, siehe unter 3.6. und 3.7.) durch nicht-kovalente Kräfte in seiner ursprünglichen Form erhalten.

Auch DREESMAN und BENEDICT (1965a) und LESLIE und BENEDICT (1969) fanden, daß 50 bzw. 65 % der IgG-Moleküle des *Huhnes* nach Reduktion nicht in freie H- und L-Ketten zerfallen, sondern noch als 7S-Moleküle erhalten bleiben.

Es wäre aber auch möglich, daß die im SDS-Gel gefundenen HL-Untereinheiten (siehe unter 3.6. und 3.7.) noch je eine Antigenbindungsstelle haben und damit das Antigen binden können, wie das beim IgG des *Kaninchens* der Fall ist (FRANK und HUMPHREY, 1968).

Zu 2.:

In der vorliegenden Arbeit konnte fast kein Unterschied in der Antikörperbindung zwischen frühen und späten Antikörpern nachgewiesen werden (Unterschied eine Titerstufe).

Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von ROSENQUIST und CAMPBELL (1966), die einen Anstieg der Resistenz neutralisierender IgG-Antikörper des *Huhnes* gegenüber 2-ME im Lauf der Immunisierung von 0 % (4. Tag) über 35 % (44. Tag) auf 70 % (211. Tag; nach dritter Immunisierung) beschrieben.

Auch bei der *Maus* gibt es eine Abnahme der Empfindlichkeit der präzipitierenden IgG-Antikörper im Lauf der Immunisierung (ADLER, 1965).

Die unterschiedlichen Ergebnisse der Autoren und der vorliegenden Arbeit zur Resistenzänderung der IgG-Antikörper gegenüber 2-ME im Lauf der Immunisierung könnten auf die unterschiedlichen Methoden bei der Messung der Restaktivität nach 2-ME-Inkubation des Serums zurückzuführen sein. Der ELISA ist sensitiver als die Präzipitation oder die Neutralisation von Bakteriophagen (s.o.). Das heißt, die frühen IgG-Antikörper könnten nach der Reduktion zum Teil noch fähig sein die Antigen-Antikörper-Bindung einzugehen, aber sie können möglicherweise keine sekundäre Reaktion (Präzipitation, Neutralisation) nach der Antigen-Antikörper-Bindung mehr auslösen.

Immunglobulin IgM

Im Gegensatz zum IgG zeigten späte IgM-Antikörper eine ungleich höhere Resistenz gegenüber 2-ME als frühe IgM-Antikörper.

Bei den frühen Antikörpern fiel die Antikörperbindungsfähigkeit nach 2-ME-Inkubation des Serums wie in der Häm-agglutination (Methode 'A'; Seite 29) auf 0,4 - 12,5 %, während es bei den späten Antikörpern zu keiner Verringerung der Aktivität bei HSA- bzw. zu einer Verringerung auf die Hälfte bei *Brucella abortus*-Antikörpern kam. Die Seren der dysgammaglobulinämischen Tiere (späte Antikörper) zeigten hier einen Aktivitätsverlust auf die Hälfte (HSA) bzw. auf ein Viertel (*B. abortus*).

Bei 2-ME-Behandlung der Seren wie in der Brucellenagglutination (Methode 'B'; Seite 30) sank der Titer der frühen Antikörper bei den Kontroll- und normogammaglobulinämischen Tieren bei HSA und *B. abortus* auf Null, bei den dysgammaglobulinämischen Tieren bei HSA auf 1 und bei *B. abortus* auf 2.

Bei den späten Antikörpern blieben bei HSA noch 12 - 25 %, bei B. abortus noch 0,8 - 1,5 % der Antikörperbindungsfähigkeit übrig (siehe Tab.13 Seite 64).

Diese Ergebnisse zeigen:

1. Es bleibt auch nach der Reduktion eine Antikörperbindungsfähigkeit des IgM erhalten.
2. Die frühen IgM-Antikörper (7. Tag nach Immunisierung) sind erheblich 2-ME-sensitiver als die späten (56. Tag nach Immunisierung).
3. Auch bei IgM ist der Aktivitätsverlust nach 2-ME-Inkubation der Seren nach Methode 'B' größer als nach Methode 'A'.
4. Die frühen IgM-Antikörper der dysgammaglobulinämischen Tiere sind etwas 2-ME-resistenter als die der Kontroll- und normogammaglobulinämischen Hühner.

Zu 1. und 2.:

Es gibt keine Literaturangaben über die Änderung der Aktivität des IgM des Huhnes nach partieller Reduktion, die mit einem primären Bindungstest gemessen worden wären. Es ist nur bekannt, daß die Agglutinations-, Präzipitations- und Neutralisierungsaktivitäten des IgM des Huhnes durch 2-ME völlig zerstört werden (BENEDICT et al., 1962; FRANKLIN, 1962; UHR et al., 1962; BENEDICT et al., 1963; ROSENQUIST und GILDEN, 1963; ROSENQUIST und CAMPBELL, 1966; LESLIE und BENEDICT, 1968 und andere).

Vom IgM des Menschen weiß man, daß die monomeren Untereinheiten nicht mehr agglutinieren können, daß sie aber noch fähig sind, sich spezifisch an das Antigen zu binden (CHAN und DEUTSCH, 1960; JACOT-GUILLARMOD und ISLIKER, 1962).

Es wurde gefunden, daß die Untereinheiten des IgM beim *Menschen* (CHAN und DEUTSCH, 1960; ISHIZAKA et al., 1965b; CHAVIN und FRANKLIN, 1969) und beim *Kaninchen* (ONOUE et al., 1965a, 1965b) noch eine Antigenbindungsstelle pro monomerer Untereinheit haben (im Gegensatz zum IgG, das divalent ist).

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit würde diese Monovalenz der monomeren Untereinheiten auch für das IgM des *Huhnes* zutreffen.

Da bei den späten Antikörpern die Antikörperbindungsaktivität nach 2-ME-Inkubation des Serums unter den Bedingungen der Hämagglutination (Methode 'A'; Seite 29) zum Teil noch voll erhalten blieb (siehe Tab.13 Seite 64), müssen die Untereinheiten noch intakte Antigenbindungsstellen haben, sonst wäre der ELISA-Titer nach 2-ME-Einwirkung gesunken.

Auch die im SDS-Gel gefundenen freien H- und L-Ketten (siehe unter 3.6. und 3.7.) müssen in diesen Proben noch durch nicht-kovalente Kräfte zusammengehalten worden sein, sonst wäre eine Antikörperbindung im ELISA nicht mehr möglich gewesen.

Die frühen Antikörper erwiesen sich als erheblich 2-ME-sensitiver als die späten.

Außer einer Vermutung von ROSENQUIST und CAMPBELL (1966) über einen Anstieg der 2-ME-Resistenz im Lauf der Immunisierung auch beim IgM des *Huhnes* liegen keine diesbezüglichen Literaturangaben vor.

Im Gegensatz zum IgG konnte diese Abnahme der Empfindlichkeit des aviären IgM gegenüber 2-ME im Lauf der Immunisierung in bezug auf die Antikörperbindungsaktivität in der vorliegenden Arbeit eindeutig nachgewiesen werden.

ADLER (1965) vermutete für das IgG der *Maus* einen Anstieg der Spezifität des Antikörpers im Lauf der Immunisierung, so daß der späte Antikörper besser zum Antigen paßt als der frühe.

Dies wäre eine mögliche Erklärung für den Anstieg der 2-ME-Resistenz des IgM des *Huhnes* im Lauf der Immunisierung, wie sie in der vorliegenden Arbeit für die Antikörperbindung nachgewiesen wurde.

Wahrscheinlich ist es für das Pentamer des frühen IgM-Antikörpers, der noch nicht so spezifisch ist, noch möglich sich im ELISA an das Antigen zu binden und sich daran festzuhalten. Nach der Reduktion aber bleiben nur kovalent und nicht-kovalent gebundene monomere Untereinheiten übrig, die zwar noch eine Antigenbindungsstelle haben, diese aber ist nicht sehr spezifisch für das Antigen, die Affinität ist gering. Beim Waschvorgang des ELISA werden diese "Antikörper" wieder vom Antigen gelöst und der Titer sinkt stark ab.

Auch die späten IgM-Antikörper werden durch 2-ME in Monomere gespalten, aber deren Antigenbindungsstelle ist spezifischer für das Antigen, sie haben eine höhere Affinität zum Antigen. Sie werden deshalb beim Waschvorgang des ELISA nicht gelöst und der Titer bleibt gleich oder er fällt nur gering ab.

Zu 3.:

Die Ursache für die verminderte Antikörperbindung der IgM-Antikörper nach Inkubation der Seren mit 2-ME nach Methode 'B' (= Brucellenagglutinationsverhältnisse; Seite 30) könnte neben der Dissoziation in freie H- und L-Ketten auch in der von SCHROHENLOHER et al. (1964) und von HOLBURN et al. (1971) beschriebenen Veränderung der Form der Antigenbindungsstelle durch Reduktion liegen.

Brucellenantigen besteht aus mehreren sich wiederholenden antigenen Determinanten, während HSA aus einer Vielzahl unterschiedlicher Determinanten besteht (COUTINHO und MÖLLER, 1973).

Bei Methode 'B' tritt eine stärkere Veränderung des IgM-Moleküls auf als bei Methode 'A' und durch diese Änderung der Antigenbindungsstelle könnte eine Bindung von Brucellenantigen unmöglich werden, während bei HSA auch nach der Reduktion noch eine passende antigene Determinante gefunden werden könnte.

Zu 4.:

In den Seren mit den frühen Antikörpern (7. Tag nach Immunisierung) blieb bei den dysgammaglobulinämischen Tieren auch nach 2-ME-Behandlung wie in der Brucellenagglutination (Methode 'B'; Seite 30) noch ein Titer von 1 (HSA) bzw. 2 (B. abortus) erhalten, während er bei den Kontroll- und normogammaglobulinämischen Tieren bei Null lag.

Bei den dysgammaglobulinämischen Seren waren nach der 2-ME-Inkubation nach Methode 'B' noch mehr dimere Formen im SDS-Gel zu finden als bei den Kontroll- und normogammaglobulinämischen Seren (siehe unter 3.6. und 3.7.). Vielleicht wurde dadurch eine höhere Antikörperbindungsfähigkeit im ELISA erreicht.

Immunglobulin IgA

Bei den IgA-Antikörpern war ein ähnliches Verhalten gegenüber 2-ME erkennbar wie bei den IgM-Antikörpern.

Bei den frühen Antikörpern (7. Tag nach Immunisierung) sank die Antikörperbindungsfähigkeit nach 2-ME-Behandlung der Seren nach Methode 'A' (Seite 29) auf die Hälfte bis ein Achtel, bei den späten (56. Tag nach Immunisierung) blieb sie entweder gleich oder sie fiel auf die Hälfte. Die Reduktion nach 'B' (Seite 30) führte zu einem Aktivitätsverlust auf $1/8$ bis $1/16$ bei den frühen Antikörpern und auf $1/2$ bis $1/8$ bei den späten (siehe Tab.13 Seite 64).

Aus diesen Ergebnissen geht hervor:

1. IgA-Antikörper sind partiell 2-ME-resistent.
2. Späte IgA-Antikörper (56. Tag nach Immunisierung) sind 2-ME-resistenter als frühe (7. Tag nach Immunisierung).

Über die Reduktion der IgA-Antikörper des Serums gibt es in der Literatur nur sehr wenig Angaben.

DELHANTY und SOLOMON (1966) und LÖSCH et al. (1982) beschrieben, daß das IgA des *Huhnes* in der Agglutination zumindest teilweise 2-ME-resistent ist.

Das kann nach der vorliegenden Arbeit auch für die Antikörperbindungsfähigkeit des IgA bestätigt werden.

Für die Restaktivität des IgA nach der Reduktion gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten:

- a) Das monomere IgA des Serums verhält sich wie das IgG, d.h. es wird zwar auch reduziert, aber entweder bleiben die Moleküle durch nicht-kovalente Kräfte in ihrer ursprünglichen Form erhalten oder die entstandenen HL-

Untereinheiten haben jeweils noch eine Antigenbindungsstelle und können so das Antigen binden.

- b) Das polymere IgA des Serums wird zu monomeren Untereinheiten mit einer Antigenbindungsstelle reduziert (siehe IgM).
- c) Das polymere IgA des Serums wird zu monomeren Untereinheiten mit zwei (wie das intakte IgG) und HL-Untereinheiten mit einer Antigenbindungsstelle gespalten.

Der Verlust der Antikörperbindungsaktivität beruht möglicherweise darauf, daß die poly- und monomeren Formen des IgA zum Teil in freie H- und L-Ketten dissoziieren. Es wäre aber auch möglich, daß durch die 2-ME-Inkubation eine Veränderung der Antigenbindungsstelle auftritt, die eine Antigenbindung erschwert oder unmöglich macht (siehe bei IgM). Diese Veränderung wäre bei 2-ME-Behandlung des Serums nach Methode 'B' (Seite 30) stärker ausgeprägt als bei Methode 'A' (Seite 29).

Für den Unterschied der 2-ME-Resistenz der frühen und späten IgA-Antikörper gilt vielleicht ähnliches wie bei IgM-Antikörpern.

2. Strukturveränderungen

Immunglobulin IgG

Da die dysgammaglobulinämischen Hühner kaum meßbare Serum-IgG-Konzentrationen aufwiesen, beziehen sich die Ergebnisse zum IgG nur auf die Kontroll- und normogammaglobulinämischen Tiere.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen über die Behandlung der Seren mit 2-ME konnten sowohl unter den Bedingungen der Häm- als auch der Brucellenagglutination (Seite 29/30) in der SDS-PAGE in keiner Probe mehr intakte IgG-Moleküle (MG 170.000) nachgewiesen werden. Es traten nur HL-Untereinheiten (MG 95.000) und freie H- und L-Ketten (MG 70.000 und 25.000) auf (siehe unter 3.6. und 3.7.).

HL-Untereinheiten (MG 95.000)

DREESMAN und BENEDICT (1965a) fanden nach partieller Reduktion, Alkylierung und anschließender Gelfiltration von reinem IgG des Huhnes eine Dissoziation der IgG-Moleküle von 50 %, LESLIE und BENEDICT (1969) eine solche von etwa 35 %, d.h. 50 bzw. 35 % der IgG-Moleküle sedimentierten in der Ultrazentrifuge noch bei 7S, der Rest war auch ohne Dispergent (z.B. Harnstoff) in H- und L-Ketten bzw. H-Kettendimere und L-Kettendimere zerfallen. Die 7S-Moleküle enthielten keine zwischenkettigen Disulfidbrücken mehr.

DREESMAN und BENEDICT (1965a) und LESLIE und BENEDICT (1969) behandelten das reine IgG für eine Stunde bei Zimmertemperatur mit 0,1 m 2-ME.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Serum 90 Minuten bei 37°C mit 0,1 m 2-ME und anschließend, abhängig von der Methode (Häm- oder Brucellenagglutination, Seite 29/30) 18 bis 24 Stunden bei 4°C oder 37°C mit 0,066 m 2-ME inkubiert.

SDS, eine dispergierende Substanz, trennt die nicht-kovalenten Bindungen in einem Molekül. Deshalb kann die SDS-PAGE benutzt werden, um kovalente Bindungen nachzuweisen (BEALE und KENT, 1977).

Das bedeutet, daß in den vorliegenden Untersuchungen nach der SDS-PAGE zwischen den HL-Untereinheiten noch intakte Disulfidbrücken, also kovalente Bindungen vorhanden sein müssen.

Die stärkere Spaltung der zwischenkettigen Disulfidbrücken bei DREESMAN und BENEDICT (1965a) trotz kürzerer Einwirkungszeit des 2-ME im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß bei der Reduktion reiner IgG-Antikörper eine stärkere Spaltung der zwischenkettigen Disulfidbrücken im IgG-Molekül des Huhnes stattfindet als bei Reduktion des Gesamtserums. Im Gesamtserum befinden sich noch viele andere Disulfidbrücken (andere Immunglobuline und Proteine), die durch das 2-ME getrennt werden, weshalb sich die Wirkung des 2-ME nicht nur auf das IgG beschränkt.

H- und L-Ketten (MG 70.000 und 25.000)

Bei der Affinitätschromatographie müssen die H- und L-Ketten, die im SDS-Gel als einzelne Banden auftraten, noch durch nicht-kovalente Kräfte zusammengehalten worden sein. L-Ketten binden kein Antigen (FLEISCHMAN et al., 1962; DREESMAN, 1966), also können sie das an das Affinitätsgel

gekoppelte HSA nicht binden. Sie hätten im Wascheluat erscheinen müssen und nicht im Haupteluat. Es bleibt nur die Erklärung, daß die später im SDS-Gel sichtbaren freien H- und L-Ketten bei der Affinitätschromatographie noch nicht-kovalent gebunden waren, die H-Ketten das HSA banden und damit auch die L-Ketten am Affinitätsgel festgehalten wurden.

Ob die bei DREESMAN und BENEDICT (1965a) beschriebene Bildung von dimeren H- bzw. L-Kettenformen in der vorliegenden Arbeit durch den niedrigen pH (2,5) des Elutionspuffers bei der Affinitätschromatographie verhindert wurde - obwohl das Eluat sofort in einen neutralen pH-Bereich gebracht wurde - ist nicht bekannt. Diese nicht-kovalenten Aggregate wären, falls vorhanden, auf jeden Fall durch das SDS in der SDS-PAGE getrennt worden.

Bruchstück mit dem MG 55.000

Bei der im SDS-Gel gefundenen Bande mit dem MG 55.000 handelte es sich höchstwahrscheinlich um ein Fc-Stück, das möglicherweise vom IgG abgespalten wurde.

Auch DREESMAN und BENEDICT (1965a) fanden in reduzierten IgG-Proben des Huhnes ein Fc-Stück, das ein MG von 54.000 hatte (DREESMAN und BENEDICT, 1965b).

Dieses Bruchstück trat in der hier durchgeführten Untersuchung bei Kontroll- und normogammaglobulinämischen Hühnern nur bei 2-ME-Behandlung der Seren nach Methode 'B' (Seite 30) auf. Anscheinend fand bei diesen Inkubationsbedingungen eine weitergehende Spaltung der Immunglobuline statt als bei Methode 'A' (Seite 29).

Immunglobulin IgM

Die IgM-Moleküle wurden in den hier durchgeführten Untersuchungen durch Behandlung des Serums mit 2-ME unter beiden Inkubationsbedingungen (Häm- und Brucellenagglutination; Seite 29/30) völlig in monomere Untereinheiten (MG 180.000) und freie H- und L-Ketten (MG 70.000 und 25.000) gespalten.

BENEDICT (1967) fand nach der Reduktion des IgM des *Huhnes* nach Ultrazentrifugation 7S-, 5S- (aus einer H- und einer L-Kette) und 3,6S- (L-Kettendimere) Untereinheiten. Diese Bruchstücke dissoziierten in neutralen Puffern teilweise in freie H- und L-Ketten.

Monomere Untereinheit (MG 180.000)

Die Disulfidbrücken innerhalb der monomeren Untereinheit müssen in den vorliegenden Untersuchungen nach der Reduktion des Serums mit 2-ME bei beiden Inkubationsbedingungen noch erhalten gewesen sein, da die Polypeptidketten beim Lauf des SDS-Gels nicht getrennt wurden (BEALE und KENT, 1977; siehe unter 3.6. und 3.7. und unter HL-Untereinheiten des IgG).

Da die Untersuchungen bei BENEDICT (1967) mit Ultrazentrifugation vorgenommen wurden, ist unbekannt, in welchem Ausmaß kovalente Bindungen zwischen den Untereinheiten vorhanden waren. Es ist aber anzunehmen, daß ein Großteil der Untereinheiten nur durch nicht-kovalente Kräfte zusammengehalten wurde, da sie zum Teil in freie H- und L-Ketten dissoziierten.

H- und L-Ketten (MG 70.000 und 25.000)

Für die H- und L-Ketten des reduzierten IgM gilt das gleiche wie für die des IgG.

Zusätzlich wurden nach der Reduktion des Serums mit 2-ME noch Bruchstücke mit dem MG 360.000, 55.000 und 30.000 im SDS-Gel gefunden, die in der PAGE-CIEP keinem Immunglobulin zugeordnet werden konnten.

In der PAGE-CIEP fiel auf, daß mit den monospezifischen (H-Ketten-spezifischen) Antiseren gegen Hühner-Immunglobuline nur einige Immunglobulin-Bruchstücke identifiziert werden konnten.

REISNER und FRANKLIN (1961) beschrieben einen Verlust an antigener Aktivität bei den Immunglobulinen nach Sulfhydrylbehandlung.

Da aber die monomeren und die HL-Untereinheiten in der vorliegenden Arbeit eindeutig mit diesen monospezifischen Antiseren reagierten, ist anzunehmen, daß bei den anderen Bruchstücken die verwendete Antiserumkonzentration nicht in der Äquivalenzzone lag, in der deutlich sichtbare Präzipitate zwischen dem Antigen (hier Antikörperbruchstücke) und dem im Agargel enthaltenen Antikörper auftreten. Die L-Ketten reagierten, wie erwartet, nur mit dem polyspezifischen Antiserum und nicht mit den monospezifischen, die nur gegen die H-Ketten gerichtet sind.

Bruchstück mit dem MG 360.000

Das Bruchstück mit dem MG 360.000 kann als dimere Form des reduzierten IgM angesehen werden, da IgG nach der Reduktion dissoziiert (siehe unter 3.6. und 3.7.) und eine Anwesenheit von IgA auf dem SDS-Gel auszuschließen ist. IgA war vor der 2-ME-Behandlung des Serums nicht im SDS-Gel erkennbar, deshalb können die Fragmente, die in noch geringerer Konzentration vorliegen müßten, nicht im SDS-Gel zeichnen.

BEALE (1974) fand bei der milden Reduktion des IgM vom *Schwein* und ASKONAS und PARKHOUSE (1971) und PARKHOUSE (1975) beim IgM der *Maus* neben 7S- und HL-Untereinheiten auch oligomeres IgM nach der SDS-PAGE.

Auffällig war, daß diese dimeren Formen nicht in allen 2-ME-behandelten Serumpools auftraten. Da die Banden im SDS-Gel zum Teil nur schwach sichtbar waren, besteht die Möglichkeit, daß dieses Bruchstück auch in den anderen Serumpools vorhanden war, aber in zu geringer Konzentration, um im SDS-Gel zeichnen zu können.

Bruchstück mit dem MG 55.000

Die Bande mit dem MG 55.000 könnte sowohl vom IgG (siehe dort) als auch vom IgM stammen und ein Fc-Stück des Immunglobulins sein.

Sie trat nur in den Seren der dysgammaglobulinämischen Hühner, in denen nur IgM durch das SDS-Gel nachweisbar war, bei den frühen und späten Antikörpern nach beiden 2-ME-Behandlungen (Seite 29/30) auf, in den Seren der Kontroll- und normogammaglobulinämischen Tiere nur nach 2-ME-Inkubation nach Methode 'B' (bei frühen und späten

Antikörpern (siehe Tab.14 Seite 66).

Über das Fc-Stück des IgM des *Huhnes* gibt es in der Literatur keine Angaben zum Molekulargewicht. Da die Polypeptidketten des IgG und des IgM aber ein ähnliches MG haben, könnte man schließen, daß das Fc-Stück des IgM im MG auch zwischen 50.000 und 60.000 liegen müßte, wie das beim IgG der Fall ist (DREESMAN und BENEDICT, 1965b).

MARKS und BOSMA (1983) beschrieben beim IgM der *Maus* das Auftreten zweier H-Ketten nach der Reduktion und der SDS-PAGE. Eine davon hatte ein MG von 78.000, die andere von etwa 53.000. Die kleinere zeigte ähnliche, wenn nicht identische antigene Determinanten wie die konstante Region der schweren Kette, aber die charakteristischen Determinanten der variablen Region fehlten.

Es wäre möglich, daß auch das *Huhn* eine solche "defekte" H-Kette besitzt. Das ist aber bei den Kontroll- und normogammaglobulinämischen Hühnern unwahrscheinlich, da in deren Seren nur nach 2-ME-Behandlung nach Methode 'B' (Brucellenagglutinationsverhältnisse) dieses Bruchstück mit dem MG 55.000 auftrat.

Bei der SDS-PAGE der 2-ME-behandelten Seren der dysgammaglobulinämischen Tiere war diese Bande immer im SDS-Gel zu finden. Man könnte also vermuten, daß diese "immunologisch defekten" Hühner auch eine "defekte" H-Kette besitzen.

In der PAGE-CIEP mit polyspezifischem Antiserum traten aber nur Peaks im Bereich der Bande mit dem MG 70.000 auf. Daher gibt es drei mögliche Erklärungen für die Bande mit dem MG 55.000:

- a) Hinter der Bande verbirgt sich bei den dysgammaglobulinämischen Seren eine kleinere H-Kette, die aber andere (eventuell weniger) antigene Determinanten hat als die intakte H-Kette des IgM (siehe MARKS und BOSMA, 1983) und deshalb in der PAGE-CIEP nicht zeichnet. Bei den Seren der Kontroll- und normogammaglobulinämischen Tiere wird diese Bande durch das Fc-Stück des IgG erzeugt.
- b) Die Bande stammt in allen Proben vom Fc-Stück des IgM.
- c) In den Seren der Kontroll- und normogammaglobulinämischen Tiere verursachen die Fc-Stücke von IgG und IgM, bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern nur das Fc-Stück des IgM diese Bande im Gel.

Bruchstück mit dem MG 30.000

Das Fragment mit dem MG 30.000 scheint mit demjenigen identisch zu sein, das KOBAYASHI und HIRAI (1980) beschrieben. Es ist mit dem IgM-Molekül des *Huhnes* durch Disulfidbrücken verbunden und unterscheidet sich bei ähnlicher elektrophoretischer Beweglichkeit in seiner Antigenität und seinem Molekulargewicht von der J-Kette (MG 19.000).

Von KOBAYASHI und HIRAI (1980) wurden für jedes Immunglobulin des *Huhnes* zwei L-Ketten mit den Molekulargewichten 21.000 und 25.000 beschrieben.

Durch die PAGE-CIEP wurde in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen, daß es sich bei dem Bruchstück mit dem MG 30.000 um eine zweite L-Kette handelte, da eine L-Kette in der PAGE-CIEP mit polyspezifischem Antiserum hätte zeichnen müssen.

Immunglobulin IgA

Da IgA im SDS-Gel nicht als sichtbare Bande zeichnete, konnten keine Untersuchungen zur Strukturänderung des IgA durch Einwirkung von 2-ME durchgeführt werden.

Es wurde nur festgestellt, daß auch bei IgA freie H- und L-Ketten nach der Inkubation des Serums mit 2-ME auftraten (nachgewiesen durch die PAGE-CIEP mit polyspezifischem Antiserum).

LESLIE und MARTIN (1973) fanden nach der milden Reduktion von poly- und monomeren Formen des Serum-IgA von *Hühnern* nicht-kovalent gebundene monomere Untereinheiten.

Da durch SDS nicht-kovalente Bindungen im Molekül getrennt werden (s.o.), wäre es möglich, daß in der vorliegenden Arbeit nur freie H- und L-Ketten des reduzierten IgA auftraten, aber dagegen sprechen die Ergebnisse des ELISA (siehe bei Aktivitätsänderungen des IgA).

Kommt man abschließend auf die eingangs gestellten Fragen zurück (siehe Seite 14/15), so kann zusammenfassend folgendes festgestellt werden:

Nach der Inkubation des Hühnerserums mit 2-ME bleiben keine strukturell intakten Immunglobuline übrig.

Alle Immunglobuline werden in Untereinheiten und freie H- und L-Ketten sowie einige weitere Bruchstücke zerlegt.

Bei der 2-ME-Inkubation, die der Brucellenagglutination entspricht (Seite 30) findet eine stärkere Spaltung statt als bei derjenigen, die der Hämagglutination entspricht (Seite 29).

Auch bezüglich der immunologischen Restaktivität (Antikörperbindungsfähigkeit) ist eine deutliche Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen sichtbar. Nach 2-ME-Behandlung des Serums wie in der Hämagglutination bleibt eine höhere Aktivität erhalten als bei der 2-ME-Inkubation wie in der Brucellenagglutination.

Bei den *IgG-Antikörpern* ist fast kein Unterschied in der 2-ME-Resistenz zwischen frühen (7. Tag nach Immunisierung) und späten (56. Tag nach Immunisierung) Antikörpern in bezug auf die Antikörperbindung erkennbar.

Im Gegensatz dazu sind die späten *IgM-* und *IgA-Antikörper* in der Antikörperbindung erheblich 2-ME-resistenter als die frühen.

Manche Autoren bestimmen den Gesamttiter eines Serums mit dem ELISA, indem sie statt des monospezifischen ein polyspezifisches Anti-Immunglobulin-Enzymkonjugat verwenden. Hierbei darf 2-ME nicht als Unterscheidungshilfe zwischen 2-ME-sensitiven (IgM) und 2-ME-resistenten (IgG) Antikörpern herangezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig bewiesen werden, daß beim ELISA als Antikörperbindungstest die Zeit und die Temperatur der 2-ME-Inkubation einen Einfluß auf die Antikörperaktivitäten der einzelnen Immunglobuline haben, der z.T. völlig verschieden ist von dem in der Agglutination (siehe z.B. IgM).

Die Immunglobuline der normogammaglobulinämischen Hühner verhalten sich gegenüber 2-ME bezüglich der Struktur- und Aktivitätsänderungen wie die der Kontrolltiere.

Die Immunglobuline der dysgammaglobulinämischen Tiere (praktisch kein IgG vorhanden) unterscheiden sich von denen der Kontroll- und normogammaglobulinämischen Hühner insofern, als bei ihnen das Bruchstück mit dem MG 55.000 nach jeder 2-ME-Inkubation des Serums auftritt (bei frühen und späten Antikörpern) und eine größere Menge an dimeren Formen des IgM erhalten bleibt.

Außerdem sind die frühen IgM-Antikörper der dysgammaglobulinämischen Tiere gegenüber 2-ME unter den Bedingungen der Brucellenagglutination (Seite 30) in der Antikörperbindung resistenter als die von Kontroll- und normogammaglobulinämischen Hühnern.

5. Zusammenfassung

Der Einfluß der reduzierenden Wirkung von 2-Mercaptoäthanol (2-ME) auf Struktur und immunologische Aktivität der Immunglobuline des Huhnes in der passiven Hämagglutination bzw. in der Brucellenagglutination wurde untersucht.

Dazu wurden Kontrollhühner sowie normo- und dysgammaglobulinämische Hühner der UM-B19 Linie mit Humanserumalbumin und *Brucella abortus* immunisiert und frühe (7. Tag nach der Immunisierung) und späte (56. Tag nach der Immunisierung) Antikörper von diesen Tieren gewonnen.

Aus den Seren wurden sechs Serumpools gebildet (je ein Pool früher und später Antikörper von Kontroll-, normo- und dysgammaglobulinämischen Tieren).

Diese Serumpools wurden für 90 Minuten bei 37°C mit 0,1 m 2-ME inkubiert, anschließend

- a) zwei Stunden bei Zimmertemperatur und 18 Stunden bei 4°C aufbewahrt ($\hat{=}$ Hämagglutination)
- b) 24 Stunden bei 37°C und dann zwei Stunden bei 4°C gehalten ($\hat{=}$ Brucellenagglutination)

und danach auf die Struktur- und Aktivitätsänderungen der Immunglobuline untersucht.

Die unterschiedliche Inkubation der Seren mit 0,1 m 2-ME in der Häm- bzw. Brucellenagglutination hatte keinen Einfluß auf den Agglutinationstiter.

Die 2-ME-Reduktion unter den Hämagglutinationsbedingungen führte bei allen drei Immunglobulinen (frühen und späten Antikörpern) zu einem geringeren Aktivitätsverlust in der Antikörperbindung (ELISA) als die 2-ME-Behandlung des Serums unter den Bedingungen der Brucellenagglutination.

Bei IgM- und IgA-Antikörpern - nicht aber bei den IgG-Antikörpern - war ein deutlicher Unterschied in der 2-ME-Resistenz zwischen frühen und späten Antikörpern in der Antikörperbindungsaktivität erkennbar, wobei die frühen Antikörper 2-ME-sensitiver waren als die späten.

Durch die Reduktion des Serums mit 2-ME wurden die Immunglobuline des Huhnes in folgende Bruchstücke gespalten (nachgewiesen durch Affinitätschromatographie zur Isolierung der Antikörper und ihrer Bruchstücke, SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in Kombination mit Zweidimensionaler Immunelektrophorese):

1. IgG dissoziierte in kovalent gebundene HL-Untereinheiten (MG 95.000) und freie H- und L-Ketten (MG 70.000 und 25.000).
2. IgM zerfiel völlig in kovalent gebundene monomere Untereinheiten (MG 180.000) und freie H- und L-Ketten (MG 70.000 und 25.000).
3. IgA konnte wegen zu geringer Konzentration im Serum mit den angewandten Methoden bezüglich seiner Strukturänderungen nicht untersucht werden.

Vom IgG oder IgM stammt das Bruchstück mit dem MG 55.000 (Fc-Stück), das bei Kontroll- und normogammaglobulinämischen Tieren nur nach 2-ME-Inkubation des Serums unter den Bedingungen der Brucellenagglutination auftrat.

In den 2-ME-behandelten Seren der dysgammaglobulinämischen Tiere muß dieses Bruchstück vom IgM stammen, da in diesen Seren im SDS-Gel weder IgG noch IgA erkennbar waren.

Die Bruchstücke mit dem MG 360.000 (kovalent gebundene dimere Formen) und 30.000 mußten zum reduzierten IgM-Antikörper gehören.

Die frühen IgM-Antikörper der dysgammaglobulinämischen Tiere zeigten nach 2-ME-Inkubation der Seren noch eine geringe Restaktivität im Gegensatz zu den frühen IgM-Antikörpern der Kontroll- und normogammaglobulinämischen Tiere.

6. Summary

Determination of changes in structure and activity of chicken immunoglobulins after incubation of the serum with 2-mercaptoethanol

The influence of 2-mercaptoethanol (2-ME) treatment on structure and immunologic activity of chicken immunoglobulins in the passive hemagglutination test and in the brucella agglutination test was determined.

Normal control chicken and normo- and dysgammaglobulinemic chicken of the UM-B19 line were immunized with Human serum albumin and Brucella abortus in order to gain early (7th day after immunization) and late (56th day after immunization) antibody activity in the respective serumpools.

The serumpools were incubated with 0,1 M 2-ME for 90 minutes at 37°C, then treated as follows:

- a) two hours at room temperature and 18 hours at 4°C (≙ passive hemagglutination test)
- b) 24 hours at 37°C and two hours at 4°C (≙ brucella agglutination test).

After that incubation the changes in antibody structure and activity were examined.

It was found that the different incubation conditions (hem- and brucella agglutination test) did not influence the agglutination titres.

After 2-ME treatment at hemagglutination conditions the reduction in antibody binding activity (ELISA) was less significant than at brucella agglutination conditions for all three immunoglobulins (early and late activity).

IgM- and IgA-antibodies exhibited a clear difference in early and late antibody activity after 2-ME treatment: Early antibodies were more 2-ME-sensitive in antibody binding activity than the late ones.

By reduction of the sera with 2-ME the chicken antibodies were cleaved to fragments as follows:

1. IgG dissociated into covalently bonded HL-subunits (molecular weight 95.000) and free H- and L-chains (MW 70.000 and 25.000).
2. IgM was divided into covalently bonded monomer subunits (MW 180.000) and free H- and L-chains (MW 70.000 and 25.000).
3. IgA changes in structure could not be recognized with the methods used because of the low concentrations of IgA in the sera.

The fragment pattern was proven by HSA-affinity chromatography, SDS-polyacrylamidgelelectrophoresis and SDS-polyacrylamidgelelectrophoresis in combination with crossed immuno electrophoresis.

Fragments with the MW of 55.000 (Fc-fragment) could have derived from IgG- or IgM-antibodies. They occurred only after 2-ME treatment at brucella agglutination conditions in the sera of control and normogammaglobulinemic chicken.

In the sera of dysgammaglobulinemic chicken this fragment must have derived from IgM, because neither IgG nor IgA were found in the SDS-gel.

Fragments with the MW of 360.000 (covalently bonded dimer) and 30.000 could have derived from the IgM-antibodies.

Early IgM-antibodies of dysgammaglobulinemic chicken retain some activity after 2-ME treatment in contrast to early IgM-antibodies of control and normogammaglobulinemic chicken.

7. Literaturverzeichnis

AARDEN, L.A., F. LAKMAKER and E. DE GROOT, 1977

Immunology of DNA. VI. The effect of mercaptans on IgG and IgM anti-ds DNA.

J. Immunol. Methods 16, 143-152

ADLER, F.L., 1965

Studies on mouse antibodies: II. ME-sensitive 7S antibodies in mouse antisera to protein antigens.

J. Immunol. 95, 39-47

ASKONAS, B.A. and R.M.E. PARKHOUSE, 1971

Assembly of immunoglobulin M. Blocked thiol groups of intracellular 7S subunits.

Biochem. J. 123, 629-634

AVRAMEAS, S., B. TAUDOU and S. CHUILON, 1969

Glutaraldehyde, cyanuric chloride and tetraazotized O-dianisidine as coupling reagents in the passive hemagglutination test.

Immunochemistry 6, 67-76

BEALE, D., 1974

Fragmentation and reduction of porcine 19S immunoglobulin M.

FEBS Letters 44, 236-239

BEALE, D. and A. FEINSTEIN, 1969

Studies on the reduction of a human 19S immunoglobulin M,

Biochem. J. 112, 187-194

BEALE, D. and C.M. KENT, 1977

The effect of DTT on agglutination and complement fixation by porcine 19S IgM.

Biochim. Biophys. Acta 494, 209-221

BENEDICT, A.A., 1967

Production and purification of chicken immunoglobulins.

Aus: Methods in immunology and immunochemistry

ed. by L.A. Williams and M.W. Chase;

Academic Press New York - London, Vol. I, 130-140

BENEDICT, A.A., R.J. BROWN and R.T. HERSH, 1962

The temporal synthesis and some chromatographic and ultracentrifugal characteristics of chicken antibodies.

J. Immunol. 90, 399-411

BENEDICT, A.A., R.J. BROWN and R.T. HERSH, 1963

Inactivation of high and low molecular weight chicken antibodies by mercaptoethanol.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113, 136-138

BIER, O.G., D. GÖTZE, I. MOTA und W. DIAS da SILVA, 1979

Experimentelle und klinische Immunologie

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

BRADFORD, M.M., 1976

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem. 72, 248-252

BRÜGGEMANN, J., B. FRIEDRICH, U. LÖSCH und D.O. SCHMID, 1971

Zur Antikörperproduktion dysgammaglobulinämischer
Hühner. I. Isohämagglutinine.

Z. Immun. Forsch. 141, 280-289

CHAN, L.M. and R.E. CATHOU, 1977

The role of the inter-heavy chain disulfide bond in
modulating the flexibility of immunoglobulin G anti-
body.

J. Mol. Biol. 112, 653-656

CHAN, P.C.Y. and H.F. DEUTSCH, 1960

Immunochemical studies of human serum RH agglutinins.

J. Immunol. 85, 37-45

CHAVIN, S.I. and E.C. FRANKLIN, 1969

Studies on antigen-binding activity of macroglobulin
antibody subunits and their enzymatic fragments.

J. Biol. Chem. 244, 1345-1352

CHESEBRO, B., B. BLOTH and S.-E. SVEHAG, 1968

The ultrastructure of normal and pathological IgM
immunoglobulins.

J. Exp. Med. 127, 399-409

CHHABRA, P.C. and M.C. GOEL, 1980

Normal profile of immunoglobulins in sera and tra-
cheal washings of chickens.

Res. Vet. Sci. 29, 148-152

CLEM, L.W. and P.A. SMALL, 1967

Phylogeny of immunoglobulin structure and function.
I. Immunoglobulins of the lemon shark.

J. Exp. Med. 125, 893-919

COUTINHO, A. and G. MÖLLER, 1973

B cell mitogenic properties of thymus independent
antigens.

Nature/New Biology 245, 12-14

DELHANTY, J.J. and J.B. SOLOMON, 1966

The nature of antibodies to goat erythrocytes in
the developing chicken.

Immunology 11, 103-113

DEUTSCH, H.F. and J.I. MORTON, 1957

Dissociation of human serum macroglobulins.

Science 125, 600-601

DEUTSCH, H.F. and J.I. MORTON, 1958

Human serum macroglobulins and dissociation units.

I. Physicochemical properties.

J. Biol. Chem. 231, 1107-1118

McDOUGALL, E.I. and H.F. DEUTSCH, 1964

A comparison of the native and monomer forms of macro-
globulin from pathological human serum with particu-
lar reference to electrophoretic mobility differences.

Biochem. J. 90, 163-169

DREESMAN, G.R., 1966

Chicken antibodies: classes of immunoglobulins and enzymatic and reductive dissociation of IgG.

Dissertation, University of Hawaii, Ph.D.

DREESMAN, G.R. and A.A. BENEDICT, 1965a

Reductive dissociation of chicken γ -G immunoglobulin in neutral solvents without a dispersing agent.

Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 822-830

DREESMAN, G.R. and A.A. BENEDICT, 1965b

Properties of papain-digested chicken 7S γ -globulin.

J. Immunol. 95, 855-866

EDELMAN, G.M. and M.D. POULIK, 1961

Studies on structural units of the γ -globulins.

J. Exp. Med. 113, 861-884

ENGVAL, E. and P. PERLMANN, 1972

Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA.

III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.

J. Immunol. 109, 129-135

FAHEY, J.L., 1961

Physicochemical characterization of mouse myeloma proteins: Demonstration of heterogeneity for each myeloma globulin.

J. Exp. Med. 114, 399-413

v.FELLENBERG, R., 1978

Kompendium der allgemeinen Immunologie.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

FIEDLER, H., U. LÖSCH and K. HALA, 1980

Establishment of a B-compatible chicken line with normogammaglobulinemia and dysgammaglobulinemia.

Folia Biologica (Praha) 26, 17-25

FLEISCHMAN, J.B., R.H. PAIN and R.R. PORTER, 1962

Reduction of γ -globulins.

Arch. Biochem. Biophys., Suppl. 1, 174-180

FRANK, M.M. and J.H. HUMPHREY, 1968

The subunits in rabbit anti-Forssman IgM antibody.

J. Exp. Med. 127, 967-982

FRANKLIN, E.C., 1962

Some physicochemical and biological properties of high molecular weight γ and β globulins in chicken sera.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109, 338-342

GAULTNEY, J.B., R.D. WENDE and R.P. WILLIAMS, 1971

Microagglutination procedures for febrile agglutination tests.

Appl. Microbiol. 22, 635-640

GILLETTE, K.G., 1974

Avian infectious bronchitis: demonstration of serum IgG- and IgM-neutralizing antibody by sucrose density-gradient centrifugation and mercaptoethanol reduction. Avian Diseases 18, 515-525

GREY, H.M., 1963a

Production of ME-sensitive, slowly sedimenting antibody in the duck.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113, 963-967

GREY, H.M., 1963b

Phylogeny of the immune response: studies on some physical, chemical and serologic characteristics of antibody produced in the turtle.

J. Immunol. 91, 819-825

GREY, H.M., 1967

Duck immunoglobulins: II. Biologic and immunochemical studies.

J. Immunol. 98, 820-826

HILSCHMANN, N., S. WATANABE, H.U. BARNIKOL, C.J. LAURE, J. BERTRAM, J. HORN, M. ENGELHARD, M. SCHNEIDER und L. DREKER, 1975

Die Rolle der Evolution im Immunsystem.

Nova Acta Leopoldina 218, 189-222

HOLBURN, A.M., J.P. CARTRON, J. ECONOMIDOU, B. GARDNER and N.C. HUGHES-JONES, 1971

Observations on the reactions between D-positive red cells and (¹²⁵I) IgM anti-D molecules and subunits.

Immunology 21, 499-507

- ISHIZAKA, K., T. ISHIZAKA, E.H. LEE and H. FUDENBERG, 1965a
Immunochemical properties of human γ A isohemagglutinin.
I. Comparisons with γ G- and γ M-globulin antibodies.
J. Immunol. 95, 197-208
- ISHIZAKA, K., T. ISHIZAKA and E.H. LEE, 1965b
Immunochemical properties of human γ A isohemagglutinin.
II. The effect of reduction and alkylation.
J. Immunol. 95, 771-780
- JACKSON, A.P., K. SIDDLE and R.J. THOMPSON, 1983
A monoclonal antibody to human brain-type creatine
kinase.
Biochem. J. 215, 505-512
- JACOT-GUILLARMOD, H. et H. ISLIKER, 1962
Scission et réassociation des isoagglutinines traitées
par des agents réducteurs des ponts disulfures.
Préparation d'anticorps mixtes.
Vox Sang. 7, 675-695
- KOBAYASHI, K. and H. HIRAI, 1980
Studies on subunit components of chicken polymeric
immunoglobulins.
J. Immunol. 124, 1695-1704
- LAEMMLI, U.K., 1970
Cleavage of structural proteins during the assembly
of the head of bacteriophage T₄.
Nature 227, 680-685

LAURELL, C.B., 1966

Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.

Anal. Biochem. 15, 45-52

LESLIE, G.A. and A.A. BENEDICT, 1968

Nonhemagglutinating nondissociable 7S subunits of chicken IgM antibody.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128, 1012-1016

LESLIE, G.A. and A.A. BENEDICT, 1969

Structural and antigenic relationships between avian immunoglobulins: I. The immune responses of pheasants and quail and reductive dissociation of their immunoglobulins.

J. Immunol. 103, 1356-1365

LESLIE, G.A. and L.W. CLEM, 1969

Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken.

J. Exp. Med. 130, 1337-1352

LESLIE, G.A. and L.W. CLEM, 1970

Chicken immunoglobulins: biological half-lives and normal adult serum concentrations of IgM and IgY.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134, 195-198

LESLIE, G.A. and L.W. CLEM, 1972

Phylogeny of immunoglobulin structure and function. VI. 17S, 7,5S and 5,7S anti-DNP of the turtle, *Pseudamys scripta*.

J. Immunol. 108, 1656-1664

LESLIE, G.A. and L.N. MARTIN, 1973

Studies on the secretory immunologic system of fowl.
III. Serum and secretory IgA of the chicken.

J. Immunol. 110, 1-9

LÖSCH, U., R. WANKE und M. MERKENSCHLAGER, 1982

Antikörperisotypen nach Immunisierung genuin dys-
gammaglobulinämischer UM-B19 Hühner.

Zbl. Vet. Med. A 29, 365-374

LOWE, C.R. and P.D.G. DEAN, 1974

The principles of affinity chromatography.

Aus: Affinity chromatography, Wiley and Sons,
London, 12-89

MARCHALONIS, J.J. and G.M. EDELMAN, 1968

Phylogenetic origins of antibody structure.

III. Antibodies in the primary immune response of
the sea lamprey, *Petromyzon marinus*.

J. Exp. Med. 127, 891-913

MARKS, R. and M. BOSMA, 1983

Evidence that some IgM heavy chains lack variable
regions.

Fed. Proc. 42, Abstracts

MILLER, F. and H. METZGER, 1965a

Characterization of a human macroglobulin:

I. The molecular weight of its subunits.

J. Biol. Chem. 240, 3325-3333

MILLER, F. and H. METZGER, 1965b

Characterization of a human macroglobulin.

II. Distribution of the disulfide bonds.

J. Biol. Chem. 240, 4740-4745

MINDEN, P., R.T. REID and R.S. FARR, 1966

A comparison of some commonly used methods for detecting antibodies to bovine albumin in human serum.

J. Immunol. 96, 180-187

MURPHY, F.A., J.W. OSEBOLD and O. AALUND, 1965

Physical heterogeneity of bovine γ -globulins:

Characterization of γ^M and γ^G globulins.

Arch. Biochem. Biophys. 112, 126-136

MYERS, D.M. and A.A. SINIUK, 1970

Preliminary report on the development of an diffusion-in-gel-method for the diagnosis of ram epididymitis.

Appl. Microbiol. 19, 335-342

OLSON, P.R., B.J. WEIBLEN, J.J. O' LEARY, A.J. MOSCOWITZ and J. McCULLOUGH, 1976

A simple technique for the inactivation of IgM antibodies using dithiothreitol.

Vox Sang. 30, 149-159

ONOE, K., Y. YAGI, A.L. GROSSBERG and D. PRESSMAN, 1965a

Number of binding sites of rabbit macroglobulin antibody and its subunits.

Immunochemistry 2, 401-415

ONOUÉ, K., N. TANIGAKI, Y. YAGI and D. PRESSMAN, 1965b

IgM and IgG anti-Hapten antibody: hemolytic, hem-agglutinating and precipitating activity.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120, 340-346

PARKHOUSE, R.M.E., 1975

Non-covalent association of IgM subunits produced by reduction and alkylation.

Immunology 27, 1063-1071

PIROFSKY, B. and E.R. ROSNER, 1974

DTT-test: a new method to differentiate IgM and IgG erythrocyte antibodies.

Vox Sang. 27, 480-488

PORTER, P. and S.H. PARRY, 1976

Further characterization of IgA in chicken serum and secretions with evidence of a possible analogue of mammalian secretory component.

Immunology 31, 407-415

RAMMENSEE, M., 1984

Immunglobulinkonzentrationen in Serum, Sekreten, Ei und Embryo des Haushuhns.

Dissertation, München

REESINK, H.W., M. VAN DER HART and J.J. VAN LOGHEM, 1972

Evaluation of a simple method for determination of IgG titre anti-A or -B in cases of possible ABO blood group incompatibility.

Vox Sang. 22, 397-407

REISNER, C.A. and E.C. FRANKLIN, 1961

Studies of ME-dissociated normal human 19S γ -globulin and pathologic macroglobulins from patients with macroglobulinemia.

J. Immunol. 87, 654-664

ROBBINS, J.B., K. KENNY and E. SUTER, 1965

The isolation and biological activities of rabbit γ M- and γ G-anti-Salmonella Typhimurium antibodies.

J. Exp. Med. 122, 385-402

ROCKEY, J.H. and H.G. KUNKEL, 1962

Unusual sedimentation and sulphhydryl sensitivity of certain isohemagglutinins and skin sensitizing antibody.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 101-105

ROITT, I., 1977

Immunologie.

Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt

ROSENQUIST, G.L. and G.R. CAMPBELL, 1966

Characteristics of the 19S and 7S response to bacteriophage ϕ X 174 in the fowl.

Immunology 10, 169-178

ROSENQUIST, G.L. and R.V. GILDEN, 1963

Chicken antibodies to bovine serum albumin.

Molecular size and sensitivity to 2-mercaptoethanol.

Biochim. Biophys. Acta 78, 543-545

SCHRAM, A.C., S.-J. HWONG and C.P. CHRISTENSON, 1971

Purification of chicken anti-bovine serum albumin antibody.

Immunology 21, 637-648

SCHRANNER, I. and U. LÖSCH, 1984

Immunological identification of avian monomeric and polymeric IgM and IgA after fractionation on SDS pore gradient polyacrylamide gels.

In Vorbereitung

SCHROHENLOHER, R.E., H.G. KUNKEL and T.B. TOMASI, 1964

Activity of dissociated and reassociated 19S anti- γ -globulins.

J. Exp. Med. 120, 1215-1229

SHAPIRO, A.L., E. VINUELA and J.V. MAIZEL, 1967

Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815-820

SIGEL, M.M. and L.W.CLEM, 1965

Antibody response of fish to viral antigens.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 126, 662-677

SOLHEIM, B.G. and M. HARBOE, 1972

Reversible dissociation of reduced and alkylated IgM subunits to half subunits.

Immunochemistry 9, 623-634

STORANDT, F., 1983

Die Beeinflussung des Isotypmusters immundefekter
Hühner durch Levamisol.

Dissertation, München

SUZUKI, T. and H.F. DEUTSCH, 1967

Dissociation, reaggregation and subunit structure
studies of some human γ M-globulins.

J. Biol. Chem. 242, 2725-2738

SZENBERG, A., P. LIND and K. CLARKE, 1965

IgG and IgM antibodies in fowl serum.

J. Exp. Biol. Med. Sci. 43, 451-454

TIZARD, I.R., 1981

Einführung in die veterinärmedizinische Immunologie.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

UHR, J.W., M.S. FINKELSTEIN and E.C. FRANKLIN, 1962

Antibody response to bacteriophage ϕ X 174 in non-
mammalian vertebrates.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111, 13-15

VAERMAN, J.-P. and J.F. HEREMANS, 1969

The immunoglobulins of the dog.

II. The immunoglobulins of canine secretions.

Immunochemistry 6, 779-786

VENYAMINOV, S.Y., E. RAJNAVOLGYI, G.A. MEDGYESI, J. GER-
GELY and P. ZAVODSZKY, 1976

The role of interchain disulfide bridges in the con-
formational stability of human immunoglobulin G1
subclass.

Eur. J. Biochem. 67, 81-86

WANKE, R., 1982

Untersuchungen zur Immunantwort dysgammaglobulinämi-
scher Hühner der Linie UM-B19.

Dissertation, München

WARR, G.W., 1982

Behavior of unreduced polymeric and monomeric immuno-
globulins in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide
gel electrophoresis.

Mol. Immunol. 19, 75-81

WEIR, D.M., 1973

Handbook of experimental immunology.

Vol. I: Immunochemistry

Blackwell Scientific Publications

Oxford/London/Edinburgh/Melbourne

WHO, 1964

Nomenclature for human immunoglobulins.

Immunochemistry 1, 145-149

WIEDERMANN, G., P.A. MIESCHER and E.C. FRANKLIN, 1963

Effect of mercaptoethanol on complement binding
ability of human 7S gammaglobulin.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113, 609-613

Herrn Prof. Dr. U. Lösch möchte ich für die Überlassung des Themas und für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. I. Schraner für die hilfreiche Einarbeitung und die vorbildliche Betreuung sowie Frau Dr. I. Kühlmann-Rabens für ihren entgegenkommenden Rat.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Labors, besonders Frau S. Friedrich, für die stete Hilfsbereitschaft.

Für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danke ich Herrn Prof. Dr. M. Merckenschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker.

Lebenslauf

- 15.11.1956 geboren in Baunach/Bamberg als Tochter
 von Emil und Johanna Uebel, geb. Seuß
- 1963 - 1967 Grundschohle in Baunach
- 1967 - 1977 Eichendorff-Gymnasium in Bamberg
- 24.6.1977 Allgemeine Hochschulreife
- 1977 - 1982 Studium der Tiermedizin an der Freien
 Universität Berlin
- 28.11.1982 Staatsexamen
- 3.12.1982 Approbation
- ab März 1983 Anfertigung der vorliegenden Disserta-
 tion
- Oktober 1983 Teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche
 bis März 1984 Hilfskraft am Institut für Physiologie,
 Physiologische Chemie und Ernährungs-
 physiologie der Tierärztlichen Fakul-
 tät der Universität München

